

**Die Analyse der cis-Regulation des *rols*-Gens und die
Beteiligung von Rols7 am Aufbau eines
podosomenähnlichen adhäsiven Komplexes (PILMAC),
der eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion bei
Drosophila melanogaster einnimmt**

Dissertation

**Zur
Erlangung des
Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat)**

**dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Dörthe Kesper
aus Frankenberg/Eder**

Marburg/Lahn 2005

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| 1. Einleitung | 2 |
| 1.1 Membranfusion und die Fusion eukaryoter Zellen | 3 |
| 1.2 Determination und Differenzierung des Mesoderms | 5 |
| 1.3 Determination und Differenzierung der somatischen Muskulatur | 7 |
| 1.4 Der Prozess der Zellfusion in der Myogenese von <i>D. melanogaster</i> und darin involvierte Proteine | 9 |
| 1.5 Das <i>rolling pebbles</i> Gen | 15 |
| 1.6 Die Transkriptionsinitiation und die Regulation der spezifischen Genexpression | 17 |
| 1.6.1 Der Core- Promotor und die Initiation der Transkription | 18 |
| 1.6.2 Der proximale Promotor, Enhancer und Silencer | 22 |
| 1.6.3 Transregulatorische Faktoren | 23 |
| 1.7 Die Evolution der regulativen DNA- Elemente | 25 |
| 1.8 Fragestellung und Zielsetzung | 29 |
| 2. Material | 31 |
| 2.1 Geräte | 31 |
| 2.2 Chemikalien | 32 |
| 2.3 Enzyme | 33 |
| 2.4 Fertige Reagentsätze | 34 |
| 2.5 Antikörper und Seren | 34 |
| 2.6 Synthetische Oligonukleotide | 35 |
| 2.7 Bakterienstämme | 37 |
| 2.8 Hefestamm | 37 |
| 2.9 Plasmide | 37 |
| 2.10 Genbanken | 38 |
| 2.11 Fliegenstämme | 38 |
| 2.12 Internet- Server | 40 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3. | Methoden | 41 |
| 3.1 | Drosophila- Zucht | 41 |
| 3.2 | Gewinnung von <i>Drosophila</i> - Embryonen | 41 |
| 3.3 | Immunhistochemische Färbungen von <i>Drosophila</i> - Embryonen | 42 |
| 3.3.1 | Fixierung | 42 |
| 3.3.2 | Devitellinisierung der Embryonen von Hand | 43 |
| 3.3.3 | Antikörperfärbung | 44 |
| 3.3.4 | Nachweis von F- Aktin durch Phalloidin | 45 |
| 3.3.5 | Einbettung der Embryonen in Epon | 45 |
| 3.4 | <i>in situ</i> - Hybridisierungen an Embryonen von <i>D. melanogaster</i> | 46 |
| 3.4.1 | Herstellung von DIG- markierten DNA- Sonden mittels PCR- Reaktion | 46 |
| 3.4.2 | Herstellung von DIG- markierten RNA- Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription | 46 |
| 3.4.3 | Spotttest der DIG- markierten Sonde | 46 |
| 3.4.4 | Vorbereitung der Embryonen | 47 |
| 3.4.5 | Hybridisierung | 47 |
| 3.4.6 | DIG- Nachweis und Färbung der Embryonen | 48 |
| 3.5 | Stammhaltung von Bakterien | 48 |
| 3.6 | Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> - Zellen | 49 |
| 3.7 | Präparation von Plasmid- DNA | 50 |
| 3.7.1 | Plasmidisolierung im analytischen Maßstab | 50 |
| 3.7.2 | Plasmidisolierung im präparativen Maßstab | 51 |
| 3.8 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 52 |
| 3.9 | Agarose- Gelelektrophorese | 52 |
| 3.10 | Isolation und Aufreinigung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen | 53 |
| 3.11 | Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase- Chain- Reaction) | 53 |
| 3.12 | RT- PCR | 54 |
| 3.13 | Modifikation von DNA- Fragmenten | 55 |
| 3.13.1 | Kinasierung von 5' Hydroxyenden nicht phosphorylierter DNA | 55 |
| 3.13.2 | Dephosphorylierung von 5'- Phosphat- Enden | 56 |
| 3.13.3 | Auffüllen von 5'- überhängenden Enden | 56 |
| 3.14 | Ligation von DNA- Fragmenten in Plasmidvektoren | 56 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.15 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 57 |
| 3.16 | DNA- Fällung mit Ethanol | 58 |
| 3.17 | Mikroinjektion | 58 |
| 3.17.1 | Aufreinigung von DNA über Elutip- Säulen | 58 |
| 3.17.2 | Vorbereitung der Embryonen für die Injektion | 59 |
| 3.17.3 | Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion | 59 |
| 3.17.4 | DNA- Injektion | 60 |
| 3.17.5 | Nachbehandlung der injizierten Embryonen | 60 |
| 3.18 | Isolation von mRNA aus <i>Drosophila</i> - Embryonen | 60 |
| 3.19 | Primer- Extension | 61 |
| 3.20 | Binding- Site- Screen | 62 |
| 3.20.1 | Titer- Bestimmung der λ -cDNA- Expressionsbank | 62 |
| 3.20.1 | Screenen der λ -cDNA- Expressionsbank | 63 |
| 3.21 | Yeast One Hybrid Screen | 64 |
| 3.21.1 | Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen | 64 |
| 3.21.2 | Titration mit 3-Amino-1, 2,4 Triazol (3- AT | 65 |
| 3.21.3 | Nachweis der β -Galactosidase- Expression | 65 |
| 3.21.4 | Screenen der MATCHMAKER cDNA- Bibliothek | 65 |
| 3.21.5 | Isolierung der Hefepasmide und Transformation der Plasmide in <i>E. coli</i> | 65 |
| 4. | Ergebnisse | 67 |
| 4.1 | Eine ca. 1 kb umfassende Deletion der Promotorregion von <i>rols6</i> führt zu einem Ausfall der <i>rols6</i> Transkription, die Transkription von <i>rols</i> ist jedoch nicht betroffen | 67 |
| 4.2 | Die Analyse der 5' vom ersten <i>rols7</i> - exon gelegenen genomischen Region auf enthaltene cis- regulatorische Sequenzen, welche die räumliche und zeitliche korrekte Transkription des <i>rols7</i> - Transkripts koordinieren | 68 |
| 4.2.1 | Ein ca. 3 kb umfassendes genomisches Fragment upstream des <i>rols</i> -Locus ist in der Lage eine räumlich und zeitlich spezifische Reportergenexpression zu steuern | 69 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.2 | Ein 1 kb Fragment upstream des <i>rols7</i> -Locus steuert eine schwache zeit- und gewebespezifische Expression des Reportergens | 71 |
| 4.2.3 | Der Vergleich zweier Konstrukte die einen Cluster von 4-Boxen bzw. E-Box ähnlichen Motiven enthalten bzw. deletieren zeigt keine Unterschiede im Niveau der Reportergenexpression | 73 |
| 4.2.4 | Ein 579 bp großes Fragment ist in der Lage eine zeit- und gewebespezifische Reportergenexpression zu gewährleisten; wird dieses Fragment 5' um weitere 47 bp verkürzt ist keine spezifische Reportergen Expression mehr nachweisbar | 74 |
| 4.2.5 | Die vorhergesagte ETS- Bindestelle im putativen <i>rols7</i> Promotor hat keine Funktion für die Reportergenexpression | 76 |
| 4.2.6 | 3' Deletionen die 100, 213 und 317 Basenpaare des Leaders umfassen führen nicht zu einer Beeinträchtigung der Reportergenexpression | 77 |
| 4.2.7 | Ein 1.3 kb langes Fragment upstream von <i>rols7</i> ist in der Lage als Enhancer eine mesodermale Reportergenexpression in transgenen Embryonen zu steuern | 78 |
| 4.2.8 | Die Regulation der viszeralen Expression von <i>rols7</i> erfolgt über Enhancer-Elemente die im 1. Intron des <i>rols</i> -Gens lokalisiert sind | 80 |
| 4.2.9 | <i>in situ</i> Hybridisierungen sowohl mit einer c-terminalen als auch einer <i>rols7</i> spezifischen Sonde zeigen, dass <i>rols7</i> auch in den Vorläufern der longitudinalen viszeralen Muskulatur exprimiert wird. | 81 |
| 4.3 | Die Analyse der putativen Promotoregion des <i>rols</i> -Gens bei <i>D. pseudoobscura</i> | 82 |
| 4.3.1 | Das <i>rols</i> -Gen ist in <i>Drosophila pseudoobscura</i> konserviert und wird in einem übereinstimmenden räumlichen und zeitlichen Muster transkribiert | 83 |
| 4.3.2 | Die putative Promotorregion des Transkripts GA16675-RA (<i>Drosophila pseudoobscura rols7</i>) ist in der Lage in transgenen Embryonen der Spezies <i>D. melanogaster</i> eine zeit- und gewebespezifische Reportergenexpression zu initiieren | 84 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3.3 | Die putative Promotorregion des Transkripts GA16675-RB (D. pseudoobscura <i>rols6</i>) ist in der Lage in transgenen Embryonen der Spezies <i>D. melanogaster</i> eine zeit- und gewebespezifische Reportergenexpression zu initiieren | 87 |
| 4.3.4 | Die vergleichende Analyse der funktionalen Promotorregionen von <i>rols6</i> und <i>rols7</i> zur Identifikation konservierter Transkriptionsfaktorbindestellen durch zPicture und rVista 2.0 | 90 |
| 4.4 | Die Identifikation des Faktors eIF3-S10 als ein im <i>rols7</i> -Promotorbereich bindendes Protein durch einen Binding-Site Screen | 92 |
| 4.4.1 | 1 Im Binding Site Screen wurde eIF3-S10 als ein im <i>rols7</i> -Promotorbereich bindendes Protein gefunden | 92 |
| 4.4.2 | Das Transkript von <i>eIF3-S10</i> ist während der Embryogenese in zahlreichen Zelltypen nachweisbar | 93 |
| 4.4.3 | Das eIF3-S10 Protein wird während der gesamten Embryogenese von <i>D. melanogaster</i> exprimiert und kann in frühen Stadien an den Spindelpolen nachgewiesen werden | 95 |
| 4.4.4 | Homozygote Embryonen für eine P-Element-Integration im 1. Intron des eIF3-S10 Gens sind embryonal letal, aber weisen keinen erkennbaren Muskelphänotyp auf | 96 |
| 4.4.5 | Die <i>rols7</i> mRNA weist eine deutliche subzelluläre Lokalisation auf | 96 |
| 4.5 | Die Festlegung des Transkriptionsstars von <i>rols7</i> | 97 |
| 4.5.1 | Die Eingrenzung des Transkriptionsstart mittels RT-PCR ergibt, dass das 1. <i>rols7</i> -Exon mind. 230 bp länger ist, als das 1. Exon der LD <i>rols7</i> cDNA | 98 |
| 4.5.2 | Die <i>in silicio</i> Feststellung eines putativen <i>rols7</i> -Transkriptionsstart mit dem Programm Markov Chain Promotor Finder „McPromoter“ MM:II | 100 |
| 4.5.3 | Die Festlegung des Transkriptionsstarts von <i>rols7</i> durch Primer-Extension | 100 |
| 4.6 | Die phänotypische Analyse von mutanten Embryonen mesodermal exprimierter Transkriptionsfaktoren | 102 |
| 4.6.1 | Mutationen der ETS-Transkriptionsfaktoren <i>pointed</i> und <i>yan</i> haben keinen Einfluss auf die Transkription von <i>rols7</i> | 102 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.6.2 | <i>Dmef2</i> mutante Embryonen zeigen keine durch die <i>rols7</i> - Promotorkonstrukte gesteuert Reportergenexpression im Dorsalgefäß | 104 |
| 4.6.3 | Die Expression von <i>Rols7</i> ist unabhängig von den Zinkfingertranskriptionsfaktoren Lameduck und Jing | 104 |
| 4.6.4 | Die phänotypische Analyse von Genen die laut BDGP <i>in situ</i> im somatischen Mesoderm exprimiert werden | 105 |
| 4.7 | Die subzelluläre Lokalisation von fusionsrelevanten Proteinen und die Auswirkung von Mutationen in fusionsrelevanten Genen auf diese Lokalisation | 107 |
| 4.7.1 | Die fusionsrelevanten Proteine <i>Rols7</i> , <i>Duf/Kirre</i> und <i>SNS</i> weisen eine übereinstimmende Membranlokalisation auf, bei der die Proteine in einer ringförmigen Struktur angeordnet sind | 108 |
| 4.7.2 | F-Actin kolokalisiert mit <i>Rols7</i> und Titin an der Kontaktstelle von FCM und Precursorzelle, jedoch nicht mit $\beta 1$ -Integrin | 110 |
| 4.7.3 | 4.7.3 Die Lokalisation von <i>Duf/Kirre</i> ist abhängig von <i>Sns</i> ; ansonsten wurde keine Abhängigkeit der Membranlokalisation von <i>Duf/Kirre</i> , <i>Sns</i> und <i>Rols7</i> von verschiedenen Komponenten der Fusionsmaschinerie nachgewiesen | 113 |
| 5. | Diskussion | 117 |
| 5.1 | Die Transkription von <i>rols7</i> wird durch einen ungewöhnlichen 3' vom Transkriptionsstart lokalisierten Promotor gesteuert | 117 |
| 5.1.1 | Die Transkription von <i>rols7</i> ist unabhängig vom <i>rols6</i> -Promotor | 117 |
| 5.1.2 | Die <i>rols7</i> mRNA ist 257 bp länger als die <i>rols7</i> LDcDNA; im Bereich des Transkriptionsstart ist kein klassisches Core-Promotor-Element lokalisiert | 118 |
| 5.1.3 | Die vergleichende Analyse der Reportergenkonstrukte RPL, ROPOZ, ROPOE, MEBOX und OEBOX zeigt, dass zwischen der Position – 875 und –1391 ein Enhancer-Element lokalisiert sein muss, welches die Expressionshöhe von <i>rols7</i> beeinflusst | 120 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.1.4 | Die Deletion des 5' vom Transkriptionsstart gelegenen Bereich lässt darauf schließen, dass die wichtigsten Promotorelemente 3' des TSS lokalisiert sind und dass die Transkriptionsinitiation unabhängig von einer ETS-Bindestelle in der Position – 28 bis –19 ist | 122 |
| 5.1.5 | 3' Deletionen des Leaderbereichs in der Position –454, –341 und –247 haben keinen Einfluss auf die Reportergenexpression und belegen, dass ein Fragment von 265 bp die wichtigsten <i>rols7</i> regulierende Elemente enthält | 123 |
| 5.1.6 | Die cis-regulatorische Elemente für die Expression von <i>rols7</i> im viszeralen Mesoderm sind im 1. Intron des Gens lokalisiert | 124 |
| 5.2 | Das <i>rols</i> -Gen und ist zwischen <i>D. melanogaster</i> und <i>D. pseudoobscura</i> konserviert und zeigt in beiden Arten ein übereinstimmendes Expressionsmuster; außerdem ist die Regulation der Transkription von übereinstimmenden DNA-Abschnitten abhängig | 126 |
| 5.2.1 | Das <i>rols</i> -Gen ist in <i>Drosophila pseudoobscura</i> konserviert und wird in den gleichen Geweben exprimiert wie das <i>D. melanogaster rols</i> | 126 |
| 5.2.2 | Die Promotorregionen von <i>rols6</i> und <i>rols7</i> sind zwischen <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Drosophila pseudoobscura</i> funktional konserviert | 127 |
| 5.3 | An der Regulation von <i>rols7</i> sind keine bekannten myogenese-relevanten Transkriptionsfaktoren beteiligt | 130 |
| 5.3.1 | Dmef2 wird nicht zur Aktivierung von <i>rols7</i> benötigt, ist aber an der ektopischen Expression des Reportergens im Dorsalgefäß beteiligt | 131 |
| 5.3.2 | Es liegen keine Hinweise darauf vor, dass Mitglieder der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren an der Regulation von <i>rols7</i> beteiligt sind | 132 |
| 5.3.3 | Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Lameduck hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von <i>rols7</i> in den Founderzellen | 133 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.3.4 | Eine Beteiligung verschiedener laut BDGP <i>in situ</i> mesodermal exprimierter Transkriptionsfaktoren bzw. Proteine bisher ungeklärter Funktion an der Regulation von <i>rols7</i> im somatischen Mesoderm konnte ausgeschlossen werden | 134 |
| 5.4 | Analyse und evolutionärer Vergleich der <i>rols7</i> -Promotorregion deuten auf einen nicht-modularen, kurzen Promotor hin, an dessen spezifischen Regulation möglicherweise generelle Transkriptionsfaktoren beteiligt sind | 135 |
| 5.5 | Der Translationsinitiationsfaktor eIF3-S10 wird während der Myogenese mesodermal exprimiert und ist dort möglicherweise an Prozessen wie mRNA-Transport und Translationsinitiation beteiligt | 137 |
| 5.6 | Die fusionrelevanten Proteine Rols7, Duf/Kirre und Sns sind in einem podosomen- und immunologische Synapsen- ähnlichen adhesiven Komplex (PILMAC) angeordnet, dessen Aufbau unabhängig von den meisten bekannten Komponenten der Fusionsmaschinerie erfolgt | 141 |
| 5.6.1 | Rols7, Duf/Kirre und SNS sind an der Kontaktstelle von fusionskompetenter Myoblaste und Founder/Precursorzelle in podosomen und immunologische Synapsen ähnliche Strukturen integriert | 141 |
| 5.6.2 | Der Aufbau des podosomalen adhäsiven Komplex erfolgt unabhängig von den meisten bekannten Komponenten der Fusionsmaschinerie aber ist vermutlich abhängig vom Zellkontakt | 149 |
| 5.6.3 | Die Entwicklung eines Modells zum Ablauf der Myoblastenfusion im zweiten Fusionsschritt der Myogenese von <i>D. melanogaster</i> anhand bekannter und im Rahmen dieser Arbeit beschriebener Daten über die Verteilung und Funktion myogenese relevanter Proteine | 152 |
| 6. | Literatur | 162 |
| | Anhang | 182 |

Zusammenfassung

Bei dem *rolling pebbles*-Gen handelt es sich um eines der essentiellen Gene für die Myoblastenfusion von *D. melanogaster*. Die Transkriptionsinitiation und die gewebespezifische Regulation des mesodermalen Transkripts *rols7* erfolgt über einen ungewöhnlichen Promotor ohne bekannte Core-Promotor-Elemente und einem Cytosin als erster Base. Für die zeit- und gewebespezifische Expression von *rols7* sind 256 bp ausreichend, von diesen sind 19 bp 5' und 237 bp 3' des Transkriptionsstarts (TSS) lokalisiert. Ein weiteres regulatives Element zur Modulation der *rols7* Expressionshöhe befindet sich 875 bp bis 1392 bp 5' des TSS. Der Enhancer für die *rols7*-Expression im viszeralen Mesoderm ist ein Bestandteil des ersten *rols*-Intron. Durch die Analyse des *rols*-Gens in *D. pseudoobscura* wurde gezeigt, dass das Protein, die Genexpression und die Regulation der Transkription konserviert sind. Die Konservierung der Genregulation konnte unabhängig für *rols6* und *rols7* anhand von Reporter-Gen-Assays in transgenen *D. melanogaster*-Embryonen verifiziert werden. Dabei wurde für die Regulation von *rols6* gezeigt, dass die funktionale Konservierung der cis-Regulatoren unabhängig von der Sequenzkonservierung der Regulatoren erfolgt und somit vermutlich eine Coevolution von cis- und transregulatorischen Elementen stattgefunden hat.

Eine Beteiligung bisher bekannter myogeneserelevanter oder mesodermal exprimierter Transkriptionsfaktoren an der Initiation der *rols7*-Transkription wurde ausgeschlossen.

Im Zuge eines Binding-Site-Screens wurde der im Bereich des *rols7*-Leader bindende Faktor Translationsinitiationsfaktor eIF3-S10 identifiziert. Möglicherweise ist eIF3-S10 an Vorgängen wie Transport und Lokalisation der mRNA und der Translationskontrolle des *rols7*-Transkripts beteiligt. Die prinzipielle Möglichkeit dazu ist gegeben, da eine Transkriptlokalisation für *rols7* nachgewiesen wurde und die Expression von eIF3-S10 zum Zeitpunkt der Myogenese im somatischen Mesoderm visualisiert wurde.

Die Analyse der Proteinlokalisation von Rols7, Duf und Sns im somatischen Mesoderm bei Wildtyp- und verschiedenen mutanten Embryonen zeigt, dass diese Proteine in einer adhäsiven Struktur organisiert sind, die den bekannten Adhäsionskomplexen Podosom und immunologische Synapse ähnelt und aufgrund dessen als PILMAC bezeichnet wird. Im Zuge der Fusion konnte die Ausdehnung des PILMACs nachgewiesen werden. Das Assembly der Struktur ist abhängig vom Zellkontakt aber unabhängig von nachgeschalteten fusionsrelevanten Proteinen. Anhand dieser Beobachtungen und aufgrund bekannter ultrastruktureller Daten wurde ein Fusionsmodell entwickelt, bei dem die Fusion der Myoblasten bei *D. melanogaster* in Korrelation gebracht wurde mit bekannten Fusionsvorgängen, wie z.B. die hypodermale Zellfusion bei *C. elegans*.

1. Einleitung

Die Entwicklungsbiologie beschäftigt sich mit den Mechanismen, welche dazu führen, dass sich aus einer einzelnen Zelle ein komplexer, vielzelliger pflanzlicher oder tierischer Organismus entwickelt, dessen Zellen z.T. sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen.

In der „klassischen“ Entwicklungsbiologie konzentrierte man sich hierbei hauptsächlich auf die morphologischen Veränderungen, die ein Embryo im Verlauf seiner Entwicklung durchläuft. Aber auch Phänomene wie die Induktion von Differenzierungsprozesse im Verlaufe der Embryonalentwicklung waren schon zu einem relativ frühen Zeitpunkt bekannt. Beispielhaft hierfür sind die Versuche zu Induktionsvorgängen am Molchembryo von Spemann und Mangold (1924). In neuerer Zeit hat sich der Schwerpunkt der entwicklungsbiologischen Forschung deutlich verlagert und Fragestellungen wie die genetische Regulation und die Mechanismen der zellulären Interaktionen sind in den Vordergrund getreten.

Da nicht jeder Organismus gleichermaßen geeignet ist für die Untersuchung entwicklungsbiologisch relevanter Fragestellungen, erfolgt ein Großteil der Forschung an einigen wenigen tierischen und pflanzlichen Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Danio rerio* und *Arabidopsis thaliana*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Modellorganismus *D. melanogaster* genutzt um bestimmte Aspekte der Mesoderm differenzierung, insbesondere der Entwicklung der synzytialen Bewegungsmuskulatur und der damit verbundenen Zellfusion zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Analyse der genetischen Regulation des für die Entwicklung der synzytialen Bewegungsmuskulatur essentiellen Gens *rolling pebbles* und auf die Funktion des Rols-Proteins bei dem Vorgang der Myoblastenfusion.

1.1 Membranfusion und die Fusion eukaryoter Zellen

Zu den wichtigsten Schritten während der Differenzierung der Bewegungsmuskulatur gehört die Fusion der Muskelgründerzellen mit den fusionskompetenten Zellen um die synzytialen Muskelfasern aufzubauen. Es handelt sich hierbei um einen so genannten extrazellulären oder extraplasmatischen Fusionsvorgang; solche extrazellulären Fusionen sind weit verbreitet und tragen neben dem Aufbau der Muskulatur bei zahlreichen Spezies zum Aufbau von Knochen und Plazenta bei Vertebraten bzw. Mammaliern bei oder führen zur Entstehung von Organen wie Hypodermis, Vulva und Uterus bei *C. elegans*. Auch bei der Fusion von Ei- und Samenzelle im Zuge der Befruchtung handelt es sich um eine extrazelluläre Fusion. Allen diesen Fusionsvorgängen gemeinsam ist, dass zunächst die Zellerkennung und die Zelladhäsion erfolgen muss, um die Zellmembranen in engen Kontakt zueinander zu bringen, bevor es zu einer Fusion der Lipid- Bilayer kommen kann. Bisher ist wenig bekannt über den Mechanismus der Membranfusion bei der Verschmelzung eukaryoter Zellen. Deutlich besser erforscht ist der Mechanismus der extrazellulären Zellfusion bei der Fusion von Viren mit der Membran von Wirtszellen. Hier scheint die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran von einem einzigen virusspezifischen Fusionsprotein gesteuert werden, dass alle Schritte des Fusion vermittelt. Bei den Fusionsproteinen handelt es sich um Glycoproteine die sich in zwei Klassen unterteilen lassen; gemeinsam ist diesen das Vorhandensein eines kurzen hydrophoben Abschnitts der als Fusionspeptid bezeichnet wird. Trotz grundlegender Unterschiede im Gesamtaufbau von Klasse 1 und Klasse 2 Fusionsproteinen scheinen beiden Klassen von Proteinen nach ihrer Aktivierung eine Konformationsänderung zu durchlaufen, die zur Freilegung des Fusionspeptids führt. Das Fusionspeptid inseriert in die Ziellmembran und durch eine erneute Konformationsänderung des Fusionsproteins werden die Membranen des Virus und der Zielzelle in Kontakt gebracht, dies führt zur Entstehung der Fusionspore und des weiteren zur vollständigen Fusion der Membranen (Review: Jahn et al., 2003).

Proteine die putative Fusionsproteine besitzen scheinen auch eine Rolle bei der Fusion eukaryoter Zellen zu spielen; Beispiele hierfür sind die Proteine Fertilin (Verschmelzung von Gameten, Wolfsberg et al., 1993) und das verwandte Protein α -Meltrin (Myoblastenfusion, Yagami-Hiromasa et al., 1995). Für das putative Fusionspeptid von Meerschweinchenfertilin konnte gezeigt werden, dass es in

artifizielle Membranen integriert und in der Lage ist die Fusion von Liposomen zu induzieren (Muga et al., 1994). Ein weiteres Protein mit einem putativen Fusionspeptid ist das bei *C. elegans* identifizierte Eff-1 Protein. Eine Mutation des *eff-1* Gens führt zum vollständigen Ausfall der epithelialen Zellfusionen bei *C. elegans* (Mohler et al., 2002).

Neben extrazellulären Fusionsvorgängen sind zahlreiche intrazelluläre Fusionsvorgänge von Vesikeln mit unterschiedlichen Membransystemen der Zelle wie z.B. Golgi-Apparat, endoplasmatisches Reticulum und Plasmamembran bekannt. Diese dienen dem Transport von Proteinen und Lipiden zwischen den unterschiedlichen Zellkompartimenten, wie z.B. dem Transport von Exkretionsproteinen vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran. An intrazellulären Fusionprozessen sind zahlreiche Proteine beteiligt, dennoch scheinen immer die gleichen basalen Prozesse abzulaufen die durch zahlreiche Cofaktoren gesteuert werden. Zunächst muss eine spezifische Erkennung und ein Andocken der Membran des Transportvesikels (Donor) und der intrazellulären Zielmembran (Akkzeptor) erfolgen. In diesen Prozess sind auf der Seite der Donor- Membran die Rab/Ypt GTPasen involviert. Diese liegen entweder als inaktive zytoplasmatische GDP-Form vor oder als aktive membrangebundene GTP-Form. Für die Lokalisation der Rab-GDP-Proteine in die korrekten endoplasmatischen Kompartimente und die Aktivierung durch den Austausch von GDP durch GTP werden die so genannten GEFs (guanine nucleotide exchange factors) benötigt. Aktive Rab-Proteine auf der Seite der Donormembran steuern die Rekrutierung von Rab-Effektoren (interagieren nur mit der GTP-Form von Rab) auf seiten der Akzeptormembran. Rab- Effektoren bilden oft große Komplexe; der am besten charakterisierte Komplex ist der Exocyst- Komplex der für die Fusion von Transportvesikeln mit der Plasmamembran von Hefe benötigt wird. Der Exocyst-Komplex besteht aus acht Untereinheiten auf Seiten der Plasmamembran die durch die an die Membran des Exocytose-Vesikels gebundene GTP-Form des Rab-Proteins Sec4p rekrutiert werden. Sec4p selbst wird als GDP-Form von dem GEF Sec2p zur Exocytosevesikelmembran rekrutiert und durch Austausch von GDP mit GTP aktiviert. Nachdem das Andocken der Membranen durch die Interaktion von Rab-GTP-Proteinen mit den Rab- Effektoren stattgefunden hat wird die Fusion der Membranen durch die SNAREs und der mit den SNAREs assoziierten SM-Proteine eingeleitet. SNARE-Proteine sind membrangebundene Proteine die gekennzeichnet

sind durch das Vorhandenseins eines SNARE-Motivs (60-70 Aminosäuren). Freie SNARE-Motive sind unstrukturiert; kommen sie jedoch in Kontakt mit einem geeigneten anderen SNARE-Motiv organisieren sie sich spontan zur vier helikalen Bündeln mit den vier SNARE-Motiven in paralleler Orientierung zu den c-terminalen Transmembranregionen der Proteine (Transkomplex). Da SNARE-Proteine sowohl in der Donor- als auch in der Akzeptormembran inseriert sind und das Assembly des Trans-Komplexes am N-terminalen Ende beginnt und dann zum C-Terminus fortschreitet werden die Membranen dicht aneinander gelagert und die bei der Zusammenlagerung des Trans-Komplexes frei werdende Energie kann genutzt werden um die Fusion der Lipidbilayer einzuleiten (Jahn et al.,2003) (Abb. 1.4).

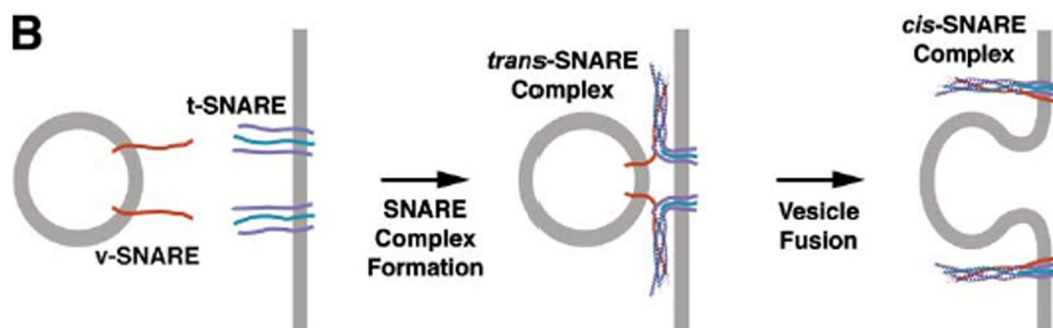


Abb. 1.4 Modell der durch v- und t-SNARE vermittelten intrazellulären Membranfusion: Die Erkennung von v-SNARE und t-SNARE führt zur Konformationsänderung der SNAREs (Trans-Komplex) und die Membranen aneinandergelagert werden. Die durch die Konformationsänderung freiwerdende Energie wird für die Fusion der Membranen genutzt. Die Auflösung des Komplexes erfolgt über den Cis-Komplex.

1.2 Determination und Differenzierung des Mesoderms

Die Bewegungsmuskulatur entwickelt sich innerhalb weniger Stunden aus dem somatischen Mesoderm von *D. melanogaster*. Dieses wird zunächst ventral angelegt und im Zuge der Gastrulation über die Bildung der Ventralfurche ins Innere des Embryos verlagert. Hier verlieren die Zellen ihren epithelialen Charakter, wandern in dorsale Richtung und bilden eine Zellschicht unterhalb des Ektoderms aus. Im Zuge der weiteren Entwicklung gehen aus unterschiedlichen Kompartimenten dieser Schicht unterschiedliche mesodermale Derivate wie somatische Muskulatur, viszerale Muskulatur, Herz und Fettkörper hervor.

Bei den frühesten Markern des zukünftigen Mesoderms handelt es sich um die Gene *twist* und *snail* die durch die Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors Dorsal in den

Zellen des ventralen Blastoderms aktiviert werden. *twist* und *snail* codieren für bHLH Transkriptionsfaktoren und aktivieren wiederum Gene die für die Differenzierung des Mesoderms benötigt werden (*Twist*) bzw. reprimieren die Expression nicht-mesodermaler Gene (*Snail*) (Leptin, 1991).

Die weitere Untergliederung des Mesoderms in Domänen mit unterschiedlichem Entwicklungsschicksal erfolgt sowohl entlang der anterior-posterioren Achse als auch entlang der dorso-ventral Achse unter der Beteiligung von intrinsischen und extrinsischen Faktoren (Abb. 1.1). Eines der wichtigsten Signale für die Untergliederung des Mesoderms entlang der dorso-ventral Achse stammt aus dem Ektoderm und wird durch Dpp vermittelt. Dpp wird dorsolateral im Ektoderm exprimiert und vermittelt an die darunter liegenden mesodermalen Zellen ein Signal, dass zur Aufrechterhaltung der Expression des von Twist aktivierten Homeobox-Gens *tinman* führt (Frasch, 1995). Tinman ist essentiell für die Ausbildung des viszeralen Mesoderms, des Herzen und der dorsalen Muskeln und ist zudem in der Lage z.B. das Homeobox-Gen *bagpipe* zu aktivieren, dass für die Differenzierung der viszeralen Muskulatur verantwortlich ist (Azpiazu und Frasch, 1993). Entlang der anterioren- posterioren Achse ist das Mesoderm ebenso wie das Ektoderm in Parasegmente untergliedert. Die Parasegmente des Mesoderms korrespondieren mit denen des Ektoderms und sind wie diese in ein anteriores und ein posteriores Kompartiment untergliedert (Azpiazu et al., 1996). Charakteristisch für das posteriore Kompartiment ist die Expression von *even skipped* (*eve*); aus den Bereichen der *eve*- Expression entwickelt sich die viszerale Muskulatur und der Fettkörper. Neben der Aktivität von *eve* müssen auch die Gene *engrailed* und *hedgehog* sowohl mesodermal als auch ektodermal exprimiert werden, um eine korrekte Entwicklung dieser Mesoderm-Derivate zu gewährleisten (Azpiazu et al., 1996; Lawrence et al., 1994; Riechmann et al. 1997). Das anteriore Kompartiment ist durch die Expression des Gens *sloppy paired* (*slp*) charakterisiert, zusätzlich benötigt wird die mesodermale und die ektodermale Expression von *wingless*. Slp ist in der Lage die Expression von *bagpipe* zu reprimieren, dies führt dazu, dass im anterioren dorsalen Kompartiment kein viszerales Mesoderm entsteht, sondern das Herz. Außerdem scheint Slp in der Lage zu sein einen hohen *twist*- Expressionslevel aufrecht zu erhalten; in Bereichen fehlender *slp*- Expression wird *twist* herunterreguliert. Allerdings ist dieser hohe *twist*- Expressionslevel nur im ventralen Bereich des

anterioren Kompartiments zu beobachten- aus diesem Bereich geht die somatische Muskulatur hervor (Riechmann et al., 1997) .

Insgesamt lassen sich also pro Parasegment vier Kompartimente differenzieller Genaktivität unterscheiden aus denen die unterschiedlichen Mesodermderivate wie Herz (dorsal- anterior), viszerale Muskulatur (dorsal- posterior), Fettkörper (ventral- posterior) und die somatische Muskulatur (ventral- anterior) hervorgehen.

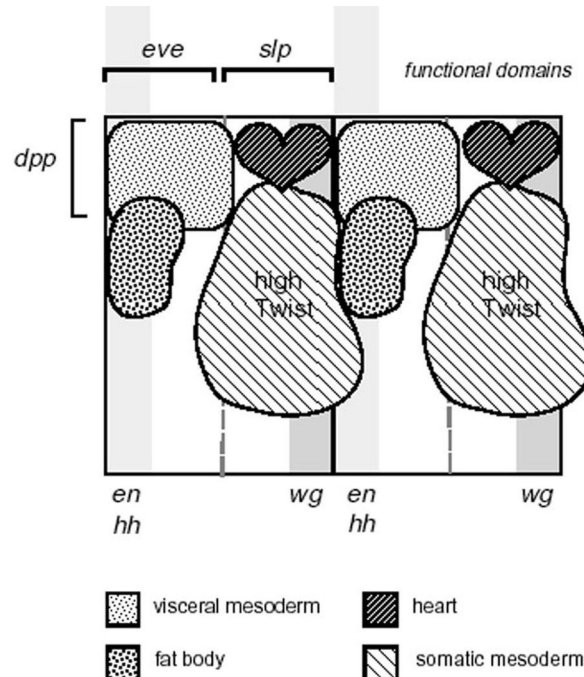


Abb.1.1 Determination des Mesoderms aus Azpiazu et al., 1996: Die Determination der unterschiedlichen Mesodermderivate erfolgt sowohl entlang der AP- als auch entlang der DV-Achse. An diesem Prozess sind sowohl extrinsische als auch intrinsische Faktoren beteiligt. Anterior-dorsal entsteht das viszerale Mesoderm, anterior-ventral der Fettkörper, posterior-dorsal das Herz und posterior-ventral die somatische Muskulatur.

1.3 Determination und Differenzierung der somatischen Muskulatur

Zum Aufbau der somatische Muskulatur in *D. melanogaster* tragen zwei Zelltypen bei - die Muskelgründerzellen und die fusionskompetenten Myoblasten (FCMs) (Bate, 1993). Beide Zellpopulationen gehen aus dem hohe Level von Twist exprimierenden ventralen Bereich des anterioren Kompartiments hervor. (Baylies et al., 1996). Innerhalb dieses Bereichs beginnt eine Zellgruppe den zu den proneuralen Genen gehörenden Transkriptionsfaktor *lethal of scute (l'sc)* zu exprimieren. Aus dieser Zellgruppe wird nun durch laterale Inhibition über den Notch-Signalwegs eine Zelle

ausgewählt. Bei dieser Zelle handelt es sich um die Progenitor-Zelle, die verbleibenden Zellen entwickeln sich zu fusionskompetenten Myoblasten. Jede Progenitor-Zelle exprimiert ein individuelles Set von Genen wie z.B. *S59*, *ladybird*, *krüppel* und *nautilus* (Carmena et al., 1995; Review Paululat et al., 1999). Die Progenitorzelle durchläuft nun eine asymmetrische Zellteilung für die unterschiedliche zelluläre Lokalisation der Proteine Numb und Inscuteable unerlässlich ist (Carmena et al., 1998). Aus diesem Teilungsschritt gehen zwei Muskelgründerzellen (bzw. eine Muskelgründerzelle und eine Vorläuferzelle für die adulte Muskulatur hervor). Eine der Muskelgründerzellen exprimiert weiter das für die Progenitorzelle spezifische Set von Genen, die andere Zelle verliert diese Expression und beginnt andere Gene zu exprimieren; dieser Schritt wird wiederum über den Notch-Signalweg reguliert. Am Ende dieses Vorgangs sind pro abdominalen Hemisegment 30 individuelle durch die Expression von unterschiedlichen Genen gekennzeichnet Founderzellen spezifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Genexpression entwickeln diese Zellen sich zu den 30 unterschiedlichen- durch Größe, Form, Position und Innervierung klar unterscheidbare- Muskeln der abdominalen Bewegungsmuskulatur (Review: Paululat et al., 1999). Die fusionskompetenten Myoblasten bilden hingegen eine relativ homogene Gruppe, deren Kerne erst nach der erfolgten Fusion mit einer Founderzelle beginnen das für die Founderzelle spezifische Gen-Set zu exprimieren (Abb. 1.2) (Review: Abmayr et al., 2004)

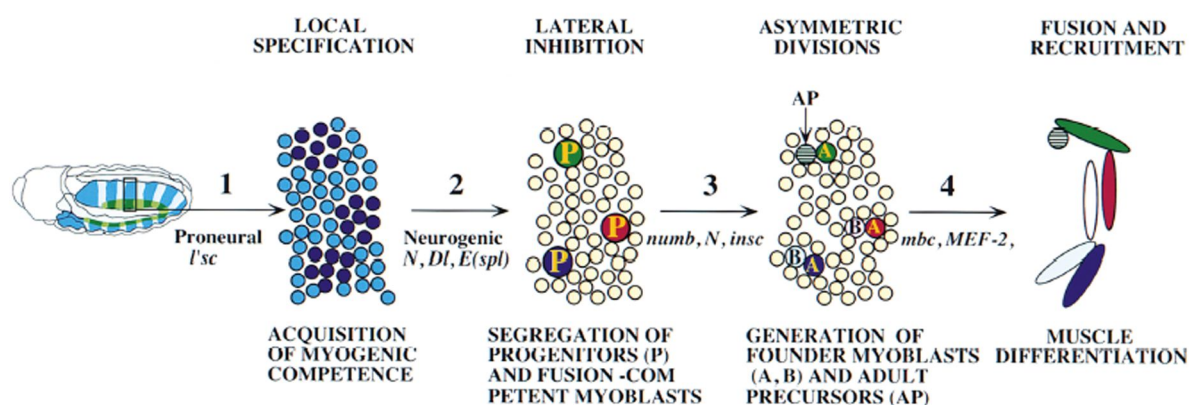


Abb. 1.2 aus Baylies et al., 1998: Modell der Auswahl und Determination der Progenitoren und Founder im somatischen Mesoderm über die Expression von *lethal of Scute* und der anschließenden durch Notch und Delta vermittelten lateralen Inhibition

Die Fusion der FCMs mit den Muskelgründerzellen ist in zwei, morphologisch und molekular unterscheidbare, Phasen gegliedert. (Rau et al., 2001) (Abb. 1.3).

Zunächst fusionieren einige FCMs mit der Gründerzelle und bilden die zwei- bis vierkernige Precursorzelle. Dann erfolgen weitere Fusionen bis die vollständige Größe der reifen Myotube erreicht wird. Fusionsdefekte die nur die zweite Phase der Fusion betreffen führen zur Entwicklung 2-4 kerniger Minimuskeln, da die ersten Fusionen stattfinden und der Prozess auf dem Niveau der Precursorzelle arretiert wird (Rau et al., 2001). Durch Untersuchungen an Maus-Mutanten für die Faktoren NFATc2 und Interleukin 4 konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie bei *D. melanogaster* auch bei Mammaliern zwei Fusionsphasen unterschieden werden können (Horsley et al., 2003; Pavlath and Horsley, 2003). Liegt aufgrund eines Gendefekts eine Störung des Fusionsprozesse vor sind bei *D. melanogaster* sowohl Gründerzellen als auch Precursorzellen in der Lage zu so genannten Minimuskeln, welche Proteine des kontraktilen Apparates exprimieren, zu differenzieren (Rushton et al., 1995). Die FCMs bleiben hingegen weitgehend undifferenziert und exprimieren nur wenige Strukturproteine wie β 3-Tubulin und MHC.

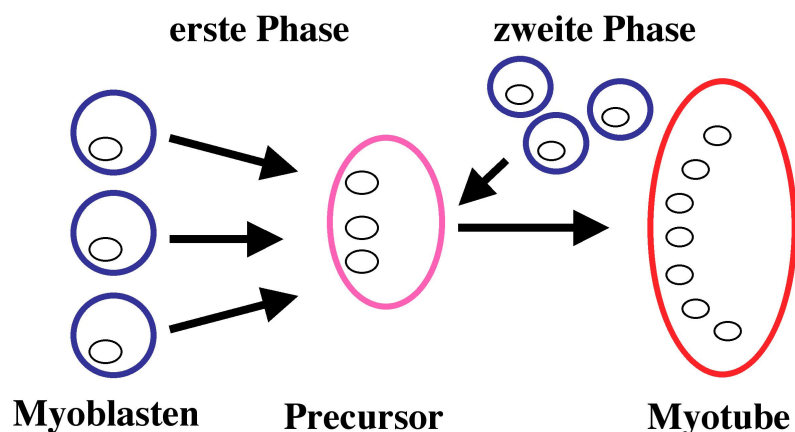


Abb. 1.3 Modell der zweiphasigen Myoblastenfusion, modifiziert nach Horsley et al., 2001. Die Fusion der Myoblasten erfolgt in zwei Phasen bei denen zunächst eine Zelle mit wenigen Kernen (Precursor) gebildet wird, die anschließend weitere Myoblasten rekrutiert und so die fertige Myotube aufbaut

1.4 Der Prozess der Zellfusion in der Myogenese von *D. melanogaster* und darin involvierte Proteine

Nach der Determination der an der Fusion beteiligten Zellgruppen von FCMs und Muskelgründerzellen setzt der eigentliche Fusionsprozess ein, bei dem ausschließlich FCMs mit Gründerzellen fusionieren. Fusionsprozesse von FCMs mit anderen FCMs und von Gründerzellen mit einer anderen Gründerzelle scheinen

ausgeschlossen. Morphologisch ist zu beobachten, dass sich zunächst die FCMs in Richtung der Gründerzellen orientieren und ein einzelnes Filopodium mit der Gründerzelle Kontakt aufnimmt (Zellerkennung). Nach dem erfolgten Zellkontakt lagern sich die Zellen aneinander (Zelladhäsion) und fusionieren miteinander. Bei der ultrastrukturellen Analyse dieses Prozesses lassen sich an den beteiligten Zellmembranen Strukturen beobachten, die dafür sprechen, dass für den korrekten Ablauf der Zellfusion sowohl extra- als auch intraplasmatische Fusionsvorgänge von entscheidender Bedeutung sind. Bei der auffälligsten Struktur die im Zuge des Fusionsprozess auftritt handelt es sich um den so genannten Präfusionskomplex (Doberstein et al., 1997). Hierbei handelt es sich um mit elektronendichten Material angefüllte Vesikel die an den Kontaktstellen von Myoblasten paarig auf den intraplasmatischen Membranseite von FCMs und Vorläuferzelle zu beobachten sind. Ein Präfusionskomplex kann bis zu 50 Vesikel auf jeder Seite der Membran umfassen. Im Zuge der Fusion ist zu beobachten, dass die Vesikel verschwinden und durch so genannte elektronendichte Plaques ersetzt werden. Diese bestehen aus in die Membran und in den extrazellulären Raum eingelagertem elektronendichten Material. Vermutlich geht diese Struktur aus einer Fusion der paarigen Vesikeln mit der Plasmamembran hervor. Abschließend ist zu beobachten, dass die Plasmamembran in der Nachbarschaft der elektronendichten Plaques vesikuliert und abgebaut wird; dieser Vorgang wird als Membranzusammenbruch bezeichnet (Doberstein, et al., 1997). Störungen der Myogenese die mit einem Ausbleiben des Fusionsprozesse einhergehen können häufig mit Störungen im Aufbau des Präfusionskomplex, der elektronendichten Plaques oder in der Membranvesikulation assoziiert werden (Abb. 1.5). Im Vertebratensystem wurde das Auftreten ähnlichen Strukturen während der Myoblastenfusion beschrieben, so konnte z.B. in $\beta 1$ -Integrinmutanten die Anhäufung von elektronendichten Plaques nachgewiesen werden. Diese Mutanten zeigen keine Vesikulation der Membran, dieser Vorgang gehört jedoch zum Ablauf des wildtypischen Fusionsprozesses (Schwander et al., 2003)

Anzumerken ist, dass bei *D. melanogaster* diese ultrastrukturellen Vorgänge an den Plasmamembranen der Zellen bisher nur bei der zweiten Fusionsphase nachgewiesen werden konnten, wenn FCMs mit der Precursorzelle fusionieren. Für die initiale Phase der Fusion bei der die FCMs mit der Muskelgründerzelle

verschmelzen konnte bisher kein Präfusionskomplex bzw. elektronendichte Plaques nachgewiesen werden (Schröter et al., 2004; Schröter et al., submitted).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Proteine beschrieben, die für einen korrekten Ablauf der Membranfusion während der Myogenese von *D. melanogaster* essentiell sind; allerdings ist für die meisten die molekulare Funktion die sie in diesem Prozess innehaben ungeklärt.

Bei einigen der bekannten Proteine handelt es sich um Transkriptionsfaktoren wie z.B. Dmef2 und Lameduck.

Dmef2 gehört zu der Familie der MADS-Box-Transkriptionsfaktoren (Bour et al., 1995) und ist in die Regulation zahlreicher mesodermal exprimierter Gene involviert (Ranganayakulu et al., 1995; Artero et al., 1998; Damm et al., 1998). *Dmef2*-Mutanten weisen einen ausgeprägten Fusionsphänotyp auf, der auf die Regulation eines oder mehrerer fusionsrelevanter Gene durch Dmef2 zurückzuführen sein könnte; eine Regulation durch Dmef2 konnte z.B. *roughest* nachgewiesen werden (Apitz et al., 2005). Bei *roughest* handelt es sich um ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie, das an dem Prozess der Zellerkennung während der Myoblastenfusion beteiligt ist. Aufgrund der Redundanz zu *duf/kirre* (s. unten) führt der Ausfall der *roughest*-Genfunktion jedoch nur zu einem schwach ausgeprägten Muskelphänotyp. Da Dmef2 bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Mesodermdestination benötigt wird, besteht die Möglichkeit, dass der beobachtete Fusionsdefekt sekundärer Natur ist und neben *roughest* kein weiteres der für die Myoblastenfusion benötigten Gene einer direkten Regulation durch Dmef2 unterliegt.

Bei Lameduck handelt es sich um einen Zinkfingertranskriptionsfaktor von dem bekannt ist, dass er Gene wie *dme2*, *myosin* und *sticks and stones (sns)* in den fusionskompetenten Myoblasten reguliert (Duan et al. 2001).

Sns codiert für ein membranständiges Protein der Immunglobulin-Superfamilie, dass nur in den FCMs exprimiert wird. Das Protein untergliedert sich in eine extrazelluläre Domäne mit acht Ig-Motiven und einer Fibronectin III-Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne (Bour et al., 2000). Über die extrazelluläre Domäne ist *Sns* in der Lage mit dem ebenfalls zur Ig-Superfamilie gehörenden Protein Duf/Kirre zu interagieren. Duf/Kirre besitzt fünf Ig-Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne und wird ausschließlich auf Seiten der Founder- und Precursor exprimiert (Ruiz-Gomez et al., 2000). Man nimmt an, dass *Sns* und Duf/Kirre in der gegenseitigen Erkennung und

Adhäsion von Founderzellen und FCMs beteiligt sind und so die spezifische Fusion der beiden Zelltypen miteinander vermitteln. Die gegenseitige Erkennung und Interaktion dieser Proteine miteinander scheint evolutionär hoch konserviert zu sein; so sind die Vertebratenhomologen Nephrin (Sns-Homolog) und NEPH1 (Duf/Kirre-Homolog) essentiell für die Funktion der Podozytenmembran der Niere (Donoviel et al., 2001; Ruotsalainen, 2000) und die homologen Proteine Syg1 und Syg2 von *C. elegans* werden für die Lokalisation bestimmter Synapsen im Bereich der Vulva benötigt. Interessanterweise wird das Vorhandensein von Syg1 und Syg2 nicht nur für die korrekte Erkennung der Synapse und mit ihrer Zielzelle benötigt, sondern ebenfalls für die Lokalisation von Vesikeln im Bereich der präsynaptischen Membran (Shen et al., 2004).

Bei Roughest und Hibris handelt es sich um weitere Proteine der Ig-Superfamilie die in die Myoblastenfusion involviert sind. Roughest ist eng verwandt mit Duf/Kirre und redundant zu diesem Protein. So ist z.B. bei Mutanten für Duf/Kirre oder Roughest nur dann ein Fusionsphänotyp zu beobachten, wenn auch das jeweilige andere Gen deletiert ist und in einer Doppelmutante ist das Einbringen eines der beiden Proteine für eine fast vollständige Rettung des Phänotyps ausreichend (Strünkelnberg et al., 2001). Im Gegensatz zu Duf/Kirre beschränkt sich die Expression von Roughest jedoch nicht auf die Gründerzellen, sondern kann auch in den FCMs beobachtet werden. Hibris ist wiederum eng verwandt mit Sns und wird ebenfalls nur in den FCMs exprimiert, die beiden Proteine scheinen jedoch nicht funktionell redundant zu sein und die Expression von Hibris in *sns*-mutanten Embryonen ist nicht in der Lage den Fusionsphänotyp zu retten (Dworak et al., 2001). Von den bisher identifizierten Mutanten von in die Myoblastenfusion involvierten Gene der Ig-Superfamilie wurden nur Embryonen des hypomorphen Allels *sns*¹⁵ ultrastrukturell analysiert. Hierbei wurde beobachtet, dass sowohl noch eine Ausbildung des Präfusionkomplexes als auch eine Auflösung des Komplexes zu den elektronendichten Plaques stattfindet. Die Plaques weisen jedoch eine abnormale Größe auf und es findet keine Vesikulation der Membran statt (Doberstein et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass sich die Funktion von Sns nicht auf die Erkennung und Adhäsion von FCMs und Gründerzellen beschränkt, da diese Prozesse anscheinend ablaufen, die Fusion der Membranen jedoch unterbleibt.

Neben den membrangebundenen Proteinen der Immunglobulin- Superfamilie wurde in den letzten Jahren sowohl membran-assoziierte als auch cytoplasmatische

Faktoren identifiziert die einen ungestörten Ablauf der Membranfusion zwischen den Zellen gewährleisten. Das Gen *myoblast city* codiert für eine cytoplasmatische Komponente der Fusionsapparatur. Mbc ist homolog zu dem humanen DOCK180-Protein und wird vermutlich sowohl von FCMs als auch den Gründerzellen exprimiert (Rushton et al., 1995; Erickson et al., 1997). Mutationen im *mbc*-Locus führen zu einem völligen Ausbleiben der Zellfusion. Ultrastrukturell ist zu beobachten, dass weder Präfusionskomplexe noch elektronendichte Plaques gebildet werden (Doberstein et al. 1997). Bei Vertebraten ist bekannt, dass DOCK180 mit dem Faktor Crk interagiert (Hasegawa et al., 1996); dieser wird für die Signaltransduktion bei der fokalen Adhäsion benötigt. Da es möglich war das *Drosophila*-Homolog von Crk (D-Crk) aufgrund seiner Interaktion mit Myoblast city zu identifizieren, ist davon auszugehen, dass diese Funktion von Myoblast city konserviert ist (Galletta et al., 1999). Die Auswirkung eines Ausfalls von D-Crk auf den Prozess der Myoblastenfusion konnte jedoch bis heute aufgrund einer fehlenden Mutante nicht untersucht werden. Mbc reguliert die Aktivität von einem oder mehreren Rac-Proteinen während der Embryogenese von *D. melanogaster* (Nolan et al., 1998), wobei MBC wahrscheinlich die Funktion eines GEFs für Rac hat (Cote and Vuori, 2002, Lu et al., 2005). Racs sind Proteine der Rho-GTPase Familie die in die Organisation des Aktin-Cytoskeletts involviert sind. Doppelmутanten für *Drac1* und 2 zeigen einen kompletten Fusionsstopp (Hakeda-Suzuki et al., 2002); auch die Expression einer konstitutiv-aktiven Form von Drac1 führt zu einem Fusionsphänotyp (Luo et al., 1994). Die Expression der dominant-aktiven Form von Drac 1 führt zu einem Ausbleiben der Membranvesikulation; die vorgelagerten Schritte wie Zellerkennung und Adhäsion sowie die Ausbildung von Präfusionskomplex und elektronendichten Plaques sind nicht betroffen (Doberstein et al., 1997).

Zu einem Stopp der Fusion auf dem Niveau des Präfusionskomplex führt ein Ausfall des Gens *blown fuse*. *blown fuse* codiert für ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein mit einer Pleckstrin Homology Domäne. PH-Domänen vermitteln häufig die Bindung von Proteinen an die Membran und können die Umstrukturierung des Cytoskeletts regulieren (Lemmon et al., 2002). Blown fuse wird nur in den FCMs exprimiert (Schröter et al., eingereicht); von einer Mutation in diesem Gen ist nur der zweite Fusionsschritt betroffen. Der Fusionsphänotyp der *blown fuse*-Mutation kann durch die Überexpression eines weiteren fusionsrelevanten Faktors zumindest teilweise

gerettet werden. Bei diesem Faktor handelt es sich um das membranassoziierte Protein Kette, das zuvor aufgrund seines ZNS-Phänotyps identifiziert wurde. Kette ist evolutionär stark konserviert und über WAVE und WASP in die Umorganisation des F-Aktin Cytoskeletts involviert (Bogdan and Klämbt, 2003). Für die Funktion von Kette während der ZNS Entwicklung konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation an der Membran essentiell ist; möglicherweise wird diese Lokalisation in den Myoblasten über die PH-Domäne von Blown Fuse vermittelt. Eine direkte Interaktion von Kette und Blown fuse konnte im Hefesystem jedoch nicht nachgewiesen werden (Bogdan, persönliche Mitteilung). Wie für *blown fuse*- Mutanten konnte ebenfalls für *kette*- Mutanten gezeigt werden, dass der erste Fusionsschritt abläuft und der Präfusionskomplex ausgebildet wird; allerdings können bei diesen Mutanten auch elektronendichte Plaques nachgewiesen werden. Diese sind jedoch wie die bei Embryonen des hypomorphen *sns*- Allels beobachteten Plaques deutlich vergrößert und die Vesikulation der Membran unterbleibt (Schröter et al., 2004).

Aufgrund seiner Funktion für die Lokalisation der Rac-Proteine an die Membran der Founder- bzw. Precursorzelle könnte der Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) Schizo/Loner ebenfalls am Rearrangement des Cytoskeletts beteiligt sein. Schizo wurde ähnlich wie Kette zunächst aufgrund eines im ZNS auftretenden Phänotyps identifiziert (Hummel et al., 1999, Önel et al., 2004). Schizo/Loner wird in den Gründerzellen exprimiert und ist an die Membran assoziiert (Chen et al., 2003). In *schizo/loner*-Mutanten ist die Fusion komplett inhibiert und es werden mononukleäre Mini-Muskeln ausgebildet. Ultrastrukturell wurde bisher noch keine Analysen durchgeführt.

Bei weiteren für den Fusionsvorgang relevanten Proteinen handelt es sich um das zelluläre Adapter-Protein Rolling pebbles (s. Punkt 1.5) und um die Cytoskelett-Komponente Titin. Neben der Funktion beim Aufbau des Sarkomers scheint Titin auch an der Formation der Myotube selbst beteiligt zu sein und Defekte im *titin*-Gen führen zur Entstehung von verkleinerten Muskeln, da nur ein Teil der FCMs mit den Myotuben fusioniert. In den fusionierenden Myoblasten ist zu beobachten, dass Titin an den Fusionsstellen angereichert wird (Zhang et al. 2000).

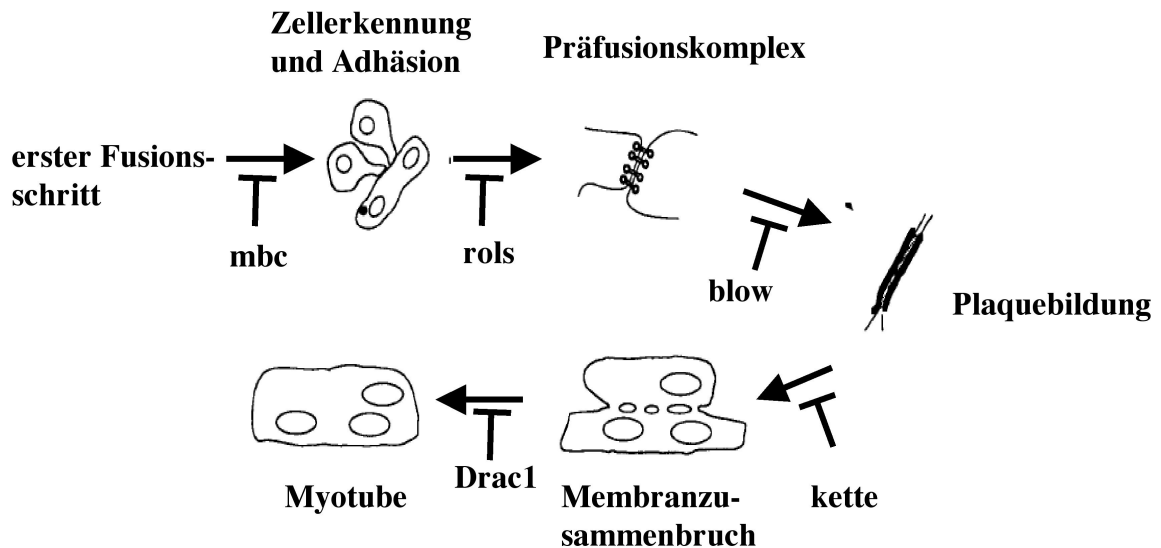


Abb. 1.5 modifiziert nach Doberstein et al., 1997. Nach dem Ablauf des ersten Fusions-schritts erfolgen die Fusionen der zweiten Fusionsphase. Auch hier muss ähnlich wie im ersten Schritt zunächst eine Erkennung der Zellen und ihre Aneinanderlagerung erfolgen. Bei nebeneinander liegenden Zellen kann zunächst der vesikuläre Präfusionskomplex beobachtet werden der sich anschließend in die elektronendichten Plaques aufgelöst wird im Anschluss erfolgt die Vesikulation der Membran. In das Modell wurde der Fusionstop von ultrastrukturell analysierten Mutanten fusionsrelevanter Gene eingefügt.

1.5 Das *rolling pebbles*-Gen

Das *rolling pebbles*-Gen (*rols*) wurde aufgrund des bei einer kleinen Deletion (Df(3L)BK9) beobachteten Muskelfusionsphänotyp identifiziert. Durch eine auf die P-Element-Insertion P1729 beruhende Plasmid-Rescue-Strategie und anschließendes „Chromosomal walking“ konnte das 60 kb umfassend *rols*-Gen im Bereich 68 F des linken Arms des III. Chromosoms lokalisiert werden. *rols* codiert für die N- terminal differentiellen Transkripte *rols6* und *rols7*. Beide Transkripte umfassen jeweils 8 Exons von denen 6 Exon beiden Transkripten gemeinsam sind und je zwei Exons transkriptspezifisch genutzt werden (Abb. 1.6).

Der Translationsstart befindet sich jeweils am Anfang des zweiten Exons; das erste Exon beider Transkripte bleibt untranslatiert. *rols6* codiert für ein 1670 Aminosäuren langes Protein von denen 79 für Rols6 spezifisch sind. Von den insgesamt 1900 Aminosäuren von Rols7 sind 309 für dieses Protein spezifisch. Beide Proteine weisen die gleiche Domänenstruktur auf mit einem RING-Finger-Motiv (N-Terminal), neun Ankyrin- Repeats und drei TPR-Repeats (C-Terminal) (Rau et al. 2001) auf. Motive wie RING- Finger; Ankyrin-Repeats und TPR-Repeats werden für die

Interaktion von Proteinen benötigt; dies macht eine Funktion von Rols als intrazelluläres Adapterproteine wahrscheinlich.

Von den beiden Transkripten wird nur *rols7* im Mesoderm transkribiert; *rols6* wird hingegen im Entoderm, den malphigischen Gefäßen und in den Apodemen transkribiert. Diese differentielle Expression spricht dafür, dass der Fusionsdefekt der Mutante auf das Fehlen von Rols7 zurückzuführen ist. Untermuert wird dies durch das Fehlen eines Fusionsdefektes bei einer *rols6* spezifischen Mutation; ein Ausfall der Genfunktion von *rols6* führt zum Auftreten eines Differenzierungsdefekts der malphigischen Gefäße (Pütz et al., 2005).

Im Mesoderm wird *rols7* in allen Muskelderivaten exprimiert; die Expression beginnt im Stadium 10 und persistiert während des gesamten Fusionsprozesses. Die Expression beschränkt sich auf die Muskelgründer- und Precursorzellen; in den FCMs kann weder das Transkript noch das Protein nachgewiesen werden (Rau et al., 2001; Menon und Chia, 2001). *rols*-Mutanten weisen einen Fusionsstopp auf dem Niveau des Precursors auf, d.h. die initiale Phase der Muskelentwicklung ist unabhängig von Rols7, in der zweiten Phase wird das Protein jedoch für die Rekrutierung weiterer Myoblasten benötigt. Ultrastrukturelle Untersuchungen mutanter Embryonen zeigen, dass die Erkennung der Zellen und die Anlagerung von Myoblasten an den Precursor zunächst erfolgt, der Zellkontakt aber nicht aufrecht erhalten wird. In späteren Stadien weichen die Zellen wieder auseinander und verlieren den Kontakt. Die Ausbildung von Präfusionkomplexen kann zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Rau et al., 2001).

In der Zelle ist das Rols7-Protein an die Plasmamembran assoziiert. Diese Assoziation erfolgt wahrscheinlich über Duf/Kirre. Es konnte gezeigt werden, daß in *duf/kirre*- und *roughest/irreC*-Doppelmutanten Rols7 nicht mehr an der Plasmamembran zu finden ist, sondern cytoplasmatisch lokalisiert ist (Chen and Olson, 2001). In einem Yeast Two Hybrid Assay wurde gezeigt, dass einer der TPR-Repeats und der RING-Finger in der Lage sind mit der cytoplasmatischen Domäne von Duf/Kirre zu interagieren (Nina Reichert, Diplomarbeit 2004). In diesem Assay wurde außerdem eine Interaktion dieser Motive mit Mbc gezeigt. Ein weiterer potentieller Interaktionspartner von Rols ist D-Titin, dessen Lokalisation an der Plasmamembran abhängig von Rols7 ist (Menon und Chia, 2001).

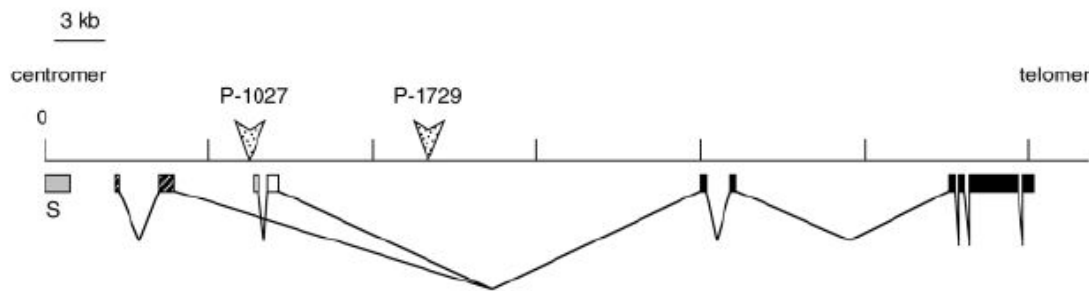


Abb. 1.6 aus Rau et al. 2001, schematischer Aufbau des *ro/s*-Genlokus mit den 6 gemeinsamen Exons (schwarz) und den *ro/s6* (weiß) und den *ro/s7* (schraffiert) spezifischen Exons. Der Insertionsort der P-Elemente p-1027 und p-1729 ist markiert.

1.6 Die Transkriptionsinitiation und die Regulation der spezifischen Genexpression

Um zu gewährleisten, dass ein komplexer Prozess wie die Differenzierung eines mehrzelligen Organismus mit seinen unterschiedlichen Geweben korrekt abläuft, muss die Genexpression einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle unterliegen, d.h. dass in jedem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung nur ein Subset der Gene aktiv ist. Fehler in der Genregulation führen häufig zu schweren Defekten und können in der Embryogenese letal sein. Auch das Auftreten von Krebs ist mit der Fehlregulation von Genen assoziiert und in Tumorzellen werden zahlreiche Proteine fehlexprimiert.

Die spezifische Regulation der Genexpression erfolgt meist auf dem Niveau der Transkriptionsinitiation, sie kann aber auch durch eine posttranskriptionale auf dem Niveau des RNA-Prozessings oder durch eine Translationsregulation der Transkripte erfolgen, wie es z.B. für zahlreiche Gene die während der Spermiogenese benötigt werden typisch ist (Review: Renkawitz-Pohl et al., 2005). Die spezifische Regulation der Transkription erfolgt über die cis-regulatorischen Sequenzen der DNA und den direkt oder indirekt mit diesen Sequenzen interagierenden trans-regulatorischen Faktoren. Zu den cis-regulatorischen Sequenzen gehören Elemente des eigentlichen Promoters und Enhancer-Elemente, die trans-regulatorischen Faktoren werden auch als Transkriptionsfaktoren bezeichnet (Lewin, Genes VII).

1.6.1 Der Core-Promotor und die Initiation der Transkription

Als Core-Promotor oder auch basalen Promotor bezeichnet man den Transkriptionsstart und den umgebenden Bereich der DNA, der für die Bindung der generellen Transkriptionsfaktoren benötigt wird und die basale Transkriptionsaktivität eines Gens gewährleistet. Obwohl keine Konsensus-Sequenz für den Core-Promotor existiert gibt es Core-Promotor-Sequenzen die in zahlreichen spezifisch regulierten Promotoren gefunden werden. Bei der ersten Base der mRNA handelt es sich häufig um ein Adenin; auf DNA-Ebene wird dieses Adenin häufig von ähnlichen Basen flankiert, die das Initiator-Element (Inr) bilden. Bei Vertebraten findet sich die Consensus-Sequenz Py-Py-A₊₁-N-T/A-Py-Py (Bucher, 1990) ; bei *Drosophila* ist der Consensus weniger flexibel und lautet TCA₊₁G/TTT/C (Purnell et al., 1994) . Das Initiator-Element kann in Kombination mit weiteren Core-Promotor-Elementen auftreten. Zu diesen gehört die TATA-Box, die sich ca. 25 bp upstream vom Start befindet und die Consensus-Sequenz TATAAA besitzt. Weitere bekannte Core-Promotor Sequenzen sind die GC-Box, das DPE und das MTE. Die GC-Box findet sich meist in der unmittelbaren Nachbarschaft der TATA-Box. Bei dem DPE handelt es sich um das so genannte Down- Stream- Promoter Element und ist 3' vom Transkriptionsstart lokalisiert. Die Lokalisation des DPEs mit den Basen A/G/T C/G A/T C/T A/C/G C/T findet sich bei den Basen + 28 bis + 32 downstream des Startpunktes. Bei der Position + 24 findet sich häufig ein G. Wird die Lokalisation des DPEs geändert führt dies bereits bei der Wegnahme oder Einfügung einer Base zu einer drastischen Reduktion des Transkriptionsniveaus. Ähnlich verhält sich das MTE genannte Motif- Ten- Element. Dieses Element ist 18-27 downstream vom Transkriptionsstart lokalisiert und wurde bisher nur in Promotoren die auch ein enthalten DPE identifiziert. Umgekehrt scheint dieser Zusammenhang nicht zu bestehen, da DPE abhängige Promotoren ohne funktionales MTE durchaus bekannt sind (Lim et al., 2004). DPE, TATA-Box und Initiator können sowohl in Kombination (z.B. DPE + Inr; DPE + Inr + TATA; Inr + TATA) als auch einzeln auftreten (Kutach and Kadonaga, 2000). Es scheint auch zahlreiche Promotoren zu existieren in denen keines dieser Elemente zu finden ist. Mittels Computeranalysen von putativen Promotor-Sequenzen wurden weitere im Promotorbereich überdurchschnittlich häufig auftauchende Sequenzen identifiziert (Ohler et al. 2002). Auch bei diesen handelt es sich möglicherweise um Core- Promotor- Sequenzen die im Rahmen der

Transkriptionsinitiation eine Rolle spielen und ähnliche Aufgaben wie DPE, TATA-Box und Initiator übernehmen. Allerdings wurde die Funktionalität dieser Elemente bisher noch nicht experimentell überprüft.

Neben Promotoren mit einem festen Transkriptionsstart gibt es auch Promotoren bei denen die Transkription von unterschiedlichen Basen aus startet. Hierbei kann es sich um Promotoren mit mehr als einem Core-Promotor handeln (Tandem-Promotoren) oder um Promotoren mit einem flexiblen Transkriptionsstart. Bei Promotoren mit einem flexiblen Transkriptionsstart erfolgt der Start der Transkription nicht bei einer festgelegten Anfangsbasis, sondern der Start kann bei einer beliebigen Basis innerhalb eines Startfensters erfolgen. Diese Promotoren scheinen keine TATA-Boxen oder Initiator-Elemente zu besitzen, allerdings wurde im Zusammenhang mit diesen Promotoren das MED (Multiple start site Element Downstream) mit der Consensussequenz GCTCC(GC) identifiziert. Ein Beispiel für einen solchen Promotor ist der Promotor des *pgp-1* Gens. Die Transkription dieses Gens kann entweder an einer einzigen Stelle (+1) oder an mehreren Stellen innerhalb eines 70 bp großen Startfensters beginnen (Ince et al., 1995). Eine Mutation des MED-Elements führt zu einer deutlichen Herabsetzung des Transkriptionslevels. Das MED wurde in 14 von 15 untersuchten Promotoren mit multiplen Start Sites gefunden und liegt ca. 20-45 bp downstream des 3'-Ende des Startfensters (Ince and Scotto, 1995).

Es ist davon auszugehen, dass alle beschriebenen Core-Promoter Elemente zur Rekrutierung des Präinitiationskomplex (PIC), bestehend aus generellen Transkriptionsfaktoren und in der Folge zur Positionierung der RNA-Polymerase an den Promotor dienen. Am besten untersucht ist der Prozess der Transkriptionsinitiation an Promotoren die eine TATA-Box enthalten. Zunächst bindet der aus dem TBP (TATA-Box-Binde-Protein) und den TAFs (TBP assoziierte Faktoren) bestehende TFIID-Komplex über die TATA-Box an den Promotor. Anschließend binden TFIIA, TFIIB und TFIIF; es wird davon ausgegangen, dass TFIIF die RNA-Polymerase zu dem im Aufbau begriffenen Komplex rekrutiert. Zu diesem Zeitpunkt kann die Initiationsreaktion erfolgen, allerdings werden weitere Faktoren wie TFIIIE und TFIIH für das Verlassen des Promotors und die Fortsetzung der Reaktion benötigt (Promoter Clearance). Neben der TATA-Box werden auch der Initiator und das DPE durch Komponenten des PIC gebunden. So konnte z.B. gezeigt werden dass TAF_{II}60 zusammen mit TAF_{II}40 an das DPE binden (Burke and

Kadonaga, 1997) und ein Komplex aus TAF_{ii}250-TAF_{ii}150 an die Inr- Sequenz bindet (Chalkley and Vernjizer, 1999)

Dieser Teil der Transkriptionsmaschinerie wurden lange Zeit für invariant gehalten, d.h. man ging davon aus, dass der PIC zur Initiation der polymerasell-abhängigen mRNA-Transkription stets aus den gleichen generellen Transkriptionsfaktoren zusammensetzt ist und die Elemente des Core-Promotors keinen Beitrag zur spezifischen Transkription eines differentiell exprimierten Gens leisten. In den letzten Jahren wurden jedoch gewebespezifische Varianten des TFIID-Komplexes identifiziert, die für die spezifische Expression bestimmter Gene unerlässlich sind. Besonders hervorzuheben sind hierbei gewebespezifische TAFs und Faktoren die mit dem TBP verwandt sind. Das erste gewebespezifische TAF wurde in einer humanen B-Zelllinie gefunden (Dikstein et al., 1996). Es handelt sich um das TAF4b; bei Mäusen konnte eine gewebespezifische Expression in Testes und Ovarien nachgewiesen werden. Der Funktionsausfall von TAF4b führt zu weiblicher Infertilität, da die Follikelzellen des Ovariums nicht korrekt ausgebildet werden; auslösend für diesen Defekt scheint die spezifische Herabregulierung von für die Follikulogenese relevanten Genen zu sein (Freiman et al., 2001). Bei *D. melanogaster* wurde die Beteiligung gewebespezifischer TAFs bisher hauptsächlich in der Spermiogenese beschrieben (White-Cooper et al., 1998; Hiller et al. 2001, Hiller et al., 2004).

Außer den gewebespezifischen TAFs wurden auch TBP verwandte Proteine als Bestandteile alternativer PICs identifiziert. Diese Proteine werden als TRFs (TBP-related factor) bezeichnet und scheinen in der Lage zu sein an bestimmten Promotoren die Funktion des TBPs zu übernehmen. So wurde gezeigt, dass das *Drosophila*- Protein dTRF1 in der Lage ist mit TFIIA und TFIIB zu interagieren, an eine TATA-Box zu binden und *in vitro* die Transkription von Polymerase II abhängigen Genen zu initiieren (Hansen et al., 1997). dTRF1 wurde aufgrund seiner Assoziation mit dem Shaker-Phänotyp identifiziert; dieser Phänotyp ist auf Defekte in der Funktion des Nervensystem zurückzuführen (Papazian et al., 1987). dTRF1 wird zunächst relativ ubiquitär exprimiert, in späteren Stadien der Embryonalentwicklung beschränkt sich die Expression jedoch auf die Gonaden und das Nervensystem. Obwohl dTRF1 die Funktion von TBP übernehmen kann interagiert es nicht mit den ubiquitär exprimierten TAFs die mit TBP interagieren, sondern mit alternativen Proteinen die in Anlehnung an die Benennung TAF als nTAFs für neuronal TRF-assoziated factors bezeichnet wurden (Hansen et al., 1997) und die zusammen mit

dTRF1 einen funktionsanalogen Komplex zu TFIID bilden. Anhand des Promotor des *tudor* Gens konnte gezeigt werden, dass dTRF1 eine Präferenz für eine TC- reiche Region 25 bp upstream von der dTRF1 abhängigen Start -Site dieses Gens besitzt (Holmes and Tjian, 2000). Das *tudor*-Gen besitzt noch eine zweite Start Site die abhängig von TFIID/TBP ist. Somit ist die Expression des *tudor*-Gens von zwei Core-Promotoren abhängig, die von unterschiedlichen „generellen“ Transkriptionsfaktoren erkannt werden; ein solcher Promotor wird auch als Tandem Promotor bezeichnet (Holmes and Tjian, 2000). Bei der Expression von RNA-Polymerase III abhängigen Promotoren hat dTRF1 in *Drosophila melanogaster* vollständig die Funktion von TBP übernommen und initiiert im Komplex mit BRF die Transkription dieser Gene (Takada et al. 2000). Bisher wurden noch keine Homologen von dTRF1 in anderen Organismen gefunden. Dies gilt auch für dTRF3 und dTRF4, jedoch nicht für dTRF2 (Rabenstein et al., 1999). Homologe Gene wurden in anderen Metazoen wie *C. elegans*, *Xenopus*, Mäusen und Menschen identifiziert (Dantonel et al., 1999; Rabenstein et al., 1999) und sind dort in die Embryonalentwicklung und der Spermatogenese beteiligt (Dantonel et al. 2000; Martianov et al., 2001; Zhang et al., 2001). Wie TBP und dTRF1 ist dTRF2 in der Lage mit TFIIA und TFIIB zu interagieren, allerdings bindet dTRF2 nicht an TATA-Boxen und ist mit anderen Gen-Loci assoziiert als TBP und dTRF1 (Rabenstein et al., 1999). Entscheidend für die Funktion von TRF2 scheint die Interaktion mit dem Faktor DREF zu sein. DREF bindet an das weit verbreitete Core-Promotor Element DRE (Hochheimer et al., 2002; Ohler et al., 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Regulation der Transkription des PCNA-Gens. Dieses Gen besitzt ähnlich wie das *tudor*-Gen einen Tandem-Promotor; die Transkriptionsinitiation von Start-Site 1 ist abhängig von TFIID/TBP und die von Start-Site 2 von DREF/dTRF2 (Hochheimer et al. 2002). Die Identifikation gewebespezifischer TFIID-Komplexe und die Existenz von TFIID alternativen Komplexen wie dTRF1/nTAFs und dTRF2/DREF und die spezifische Regulation eines Subsets von Genen durch diese Faktoren lässt den Schluss zu, dass auch die generellen Transkriptionsfaktoren zur zeit- und gewebespezifischen Transkription beitragen. Dies gilt auch für die Core-Promotor-Elemente an die diese Komplexe binden, wie z.B. das DRE-Element das durch dTRF2/DREF erkannt wird. Auch das Auftreten von durch unterschiedliche Komplexe regulierten Tandem-Core-Promotoren ist eine Möglichkeit Gene räumlich und zeitlich differentiell zu exprimieren (Review: Hochheimer and Tjian, 2003)

1.6.2 Der proximale Promotor, Enhancer und Silencer

Neben den unmittelbaren zum Core-Promoter gehörenden Sequenzen finden sich zahlreiche weitere Elemente die zur Expression eines Gens beitragen und die für spezifischen Transkriptionsinitiation und für Modulation der Expressionshöhe essentiell sind. Elemente, die in unmittelbarer upstream und downstream des Core-Promotors lokalisiert sind werden als proximale Promotor-Elemente bezeichnet. Regulative Elemente die weiter von dem Core-Promotor entfernt sind werden als distale Promotor-Elemente bzw. Enhancer bezeichnet, z.T. wird diese Bezeichnung auch nur für aktivierende Elemente angewandt und reprimierende Elemente werden Silencer genannt. Enhancer bzw. Silencer können ebenso 5' wie 3' vom Start lokalisiert sein und sowohl in Introns als auch in codierenden Bereichen liegen. Die Entfernung zum Startpunkt kann mehrere Kilobasen betragen. Häufig sind diese Elemente modular aufgebaut, d.h. sie bestehen aus mehreren dicht beieinander liegenden kurzen DNA-Elementen an die unterschiedliche spezifische Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlicher Affinität binden. Ein Beispiel ist der Enhancer der für die korrekte Expression des 2. Streifens des Paarregelgens *even skipped* benötigt wird und aus 12 DNA-Elementen besteht von den 6 eine aktivierende und 6 eine reprimierende Funktion haben (Small et al., 1992; Arnosti et al., 1996). Sowohl an die proximalen und distalen Promoter-Elemente als auch an Enhancer und Silencer binden Transkriptionsfaktoren die das Expressionsniveau und die Spezifität der Transkriptionsinitiation beeinflussen, dabei erlaubt die Nähe der proximalen Elemente zum Core-Promotor eine relativ direkte Interaktion der an diese Elemente bindenden Faktoren mit den generellen Transkriptionsfaktoren. Bei Enhancern und Silencern geht man davon aus, dass die DNA eine Schleife bilden muss um diese Elemente und die an sie bindenden Faktoren in die Nähe des Core-Promotors zu bringen. Dies bedingt, dass diese Elemente auch nicht zu dicht am Startpunkt lokalisiert sein dürfen, da sonst eine Schleifenbildung nicht mehr möglich ist.

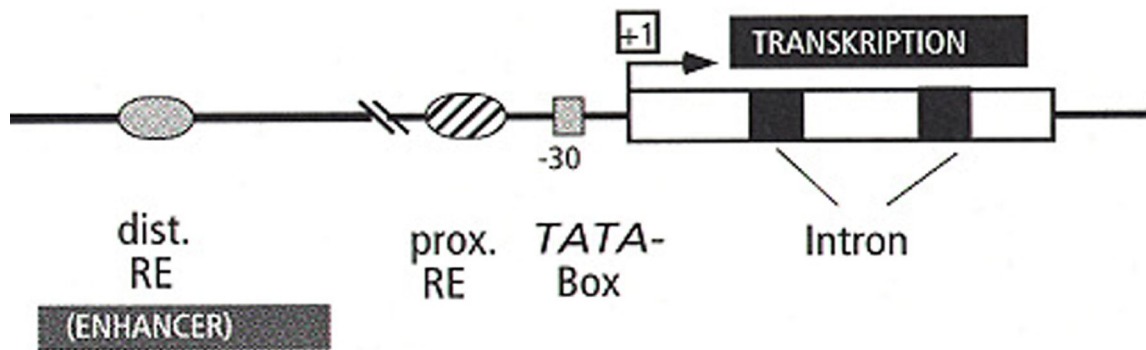


Abb. 1.7; Knippers. Der schematische Aufbau eines eukaryoten Promotors: Transkriptionsstart (+1), TATA-Box in der Region +30 und proximalen und distalen Promotorelementen.

1.6.3 Transregulatorische Faktoren

An die cis-regulatorischen Elemente binden die mit diesen Elementen interagierenden transregulatorische Faktoren. Unterschieden werden hierbei die generellen Transkriptionsfaktoren, die mit dem Core-Promotor interagieren und die spezifischen Transkriptionsfaktoren, die zeit- und gewebespezifische Expression eines Gens gewährleisten, indem sie die Transkriptionsinitiation inhibieren (Repressoren) oder fördern (Aktivatoren). Transkriptionsfaktoren sind in der Regel modular aufgebaut, d.h. sie bestehen aus einer DNA-Bindedomäne und einer Interaktionsdomäne bzw. Transaktivierungsdomäne die mit anderen Proteinen wie generellen und spezifischen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren interagiert. DNA-Bindedomäne und die Transaktivierungsdomäne sind unabhängig voneinander funktional.

Während die Transaktivierungsdomäne unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren eine hohe Variabilität aufweist zeigt sich, dass die DNA-Bindedomäne häufig stark konserviert ist und es ermöglicht die Transkriptionsfaktoren in relativ große Familien mit ähnlicher DNA-Bindedomäne zusammenzufassen. Durch die hohe Konservierung der DNA-Bindedomäne sind Vertreter dieser Familien in zahlreichen eukaryoten Organismen zu finden; dabei ist auch häufig die Funktion der Faktoren konserviert. Verschiedene Vertreter einer Familie von Transkriptionsfaktoren binden meist an ähnliche DNA-Sequenzen, interagieren jedoch mit unterschiedlichen Partnern und sind so in der Lage die Expression verschiedener Gene zu steuern.

Eine große Familie bilden z.B. die basischen Helix- Loop- Helix- Faktoren die mit dem basischen Abschnitt der bHLH-Domäne mit der DNA interagiert und mit den Helices mit anderen bHLH-Faktoren. Zu den bHLH-Faktoren gehören auch

zahlreiche Proteine, die sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* an der Myogenese beteiligt sind wie z.B. Twist oder MyoD bzw. Nautilus.

Eine weitere umfangreiche Gruppe bilden Faktoren der Zinkfinger-Familie die an die DNA über einen oder mehrere Zinkfinger binden. Zu der Familie der Zinkfingerfaktoren gehören generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren. Zu den spezifischen Transkriptionsfaktoren gehören die mesodermalen Transkriptionsfaktoren Faktoren Zfh-1, der zusätzlich für eine Homeobox codiert (Lai, et al., 1991), und Lameduck (Duan et al., 2001).

Um eine hochkonservierte Familie von Transkriptionsfaktoren handelt es sich bei den Homeodomänen-Proteinen die gekennzeichnet sind durch die 60 AS umfassende Homeobox und in allen Eukaryoten zu finden ist. Bei der Homeodomäne handelt es sich um das DNA-Bindemotiv dieser Faktoren; diese weist c-terminal Übereinstimmungen mit dem prokaryoten Helix-turn-Helix-Motiv auf. Ursprünglich identifiziert wurde die Homeobox aufgrund der in *D. melanogaster* beschriebenen homeotischen Mutanten bei denen der Funktionsausfall der homeotischen Gene zu einer Konversion von Segmenten in ein anderes führen (homeotische Transformation). Die homeotischen Gene sind auch bei Vertebraten konserviert und werden dort als Hox-Gene bezeichnet. Bei dem für die Spezifikation von Herz, viszeralen und dorsaler Muskulatur essentiellen Faktor Tinman handelt es sich ebenfalls um ein in *D. melanogaster* identifiziertes Homeobox- Protein.

Es wurden zahlreiche weitere Familien von Transkriptionsfaktoren beschrieben mit abweichenden DNA-Binde- und Transaktivierungsdomänen. An der Myogenese bzw. Mesodermentwicklung von *D. melanogaster* oder Vertebraten sind z.B. noch Proteine der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren wie PEA3 (Vertebraten) oder Yan und Pointed (*D. melanogaster*) (Klämbt et al., 1993; Price and Lai, 1998) beteiligt. Der funktionell konservierte Faktor Mef2 gehört zur Familie der MADS-Box Faktoren und ist sowohl in Vertebraten als auch in *D. melanogaster* essentiell für die Muskelbildung (Lilly et al., 1995).

Im Vertebratensystem wurden noch Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (Hribal et al., 2003) und der calciumabhängige Transkriptionsfaktor NFATc2 (Horsley et al., 2001) als myogeneserelevant beschrieben

1.7 Die Evolution der regulativen DNA-Elemente

Das Expressionsmuster orthologer Gene ist ebenso wie deren Funktion oft auch zwischen evolutionär relativ weit entfernten Spezies konserviert. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass orthologe Transkriptionsfaktoren auch über große evolutionäre Distanzen ihre Funktion beibehalten und die Expression verwandter Gene in homologen Geweben steuern. Der Grad der Konservierung kann so hoch sein, dass ein Vertebratenfaktor wie Pax6 in der Lage ist die Funktion des orthologen *Drosophila*-Proteins Eyeless zu übernehmen und die Bildung ektopischer Komplexaugen in *D. melanogaster* zu steuern (Halder et al., 1995). Auch in der Myogenese gibt es Transkriptionsfaktoren, die bei Vertebraten und Dipteren ähnliche Funktionen erfüllen, ein Beispiel ist der sowohl bei Wirbeltieren als auch *D. melanogaster* myogeneserelevante MADS-Box-Faktor Mef2.

Da die Funktion von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der differentiellen Genexpression an die Erkennung und Bindung der Faktoren an spezifische regulative DNA-Sequenzen wie Enhancer und Silencer gekoppelt ist, unterliegen regulativen Elemente ebenso wie codierende Bereichen einem selektiven Evolutionsdruck, d.h. Basenaustausche innerhalb dieser Elemente sind nicht neutral, da aufgrund einer veränderten Interaktion von Transkriptionsfaktor mit dem Regulator auch die Genexpression verändert wird. Innerhalb von nicht codierenden DNA-Sequenzen führt dies zu einer verstärkten Konservierung von regulativen Elementen wie Enhancer und Silencern. Umgekehrt eröffnet dies die Möglichkeit aufgrund von Sequenzkonservierungen in homologen Bereichen nicht codierender DNA-Abschnitte die cis-regulatorischen Elemente eines Gens zu identifizieren. So konnte z.B. ein T2-Helferzellen spezifischer Enhancer für die Gene Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin 13 aufgrund der Konservierung dieses Elements im humanen und im Maus-Genom identifiziert (Loots et al., 2000). werden. Innerhalb der *Drosophiliden* konnte z.B. der testisspezifische β 2-Tubulin-Enhancer durch die Konservierung eines 14 bp umfassenden Blocks in der Promotorregion des *D. melanogaster*- und des *D. hydei*- Gens identifiziert werden (Michiels et al., 1989).

Mit zu den am besten charakterisierten Enhancer des *Drosophila*-Genoms gehören Enhancer von Genen, die zur Segmentierungskaskade von *D. melanogaster* gehören und deren funktionale Konservierung zwischen unterschiedlich *Drosophila*-Spezies experimentell gezeigt wurde (Langeland and Carroll, 1993; Lukowitz et al., 1994 und

Ludwig et al., 1998). Hierzu gehört auch der Enhancer der die Expression des zweiten *eve*- Streifens im Blastoderm steuert und mehrere Bindestellen für die Aktivatoren Bicoid und Hunchback und für die Repressoren Giant und Krüppel besitzt (Arnosti et al., 1996). Obwohl die Enhancer verschiedener *Drosophila*-Spezies eine mit der *eve*-Expression identische Reportergenexpression in *D. melanogaster* steuern können (Ludwig et al., 1998) zeigen sich auf Sequenz-Ebene deutliche Unterschiede der Enhancer. So ist bei einem Sequenzvergleich von 13 *Drosophila*-Spezies keine der 16 aus *D. melanogaster* bekannten Bindestellen vollständig konserviert und drei Bindestellen sind nur in einem Subset der Taxa vorhanden. Zusätzlich ist eine deutliche Varianz im Abstand der Bindestellen zu beobachten. Diese Unterschiede in der Sequenz sind nicht neutral wie durch die Analyse chimäre *D. melanogaster/D. pseudoobscura* gezeigt werden konnten (Ludwig et al., 2000). Diese Form der Evolution von Enhancern (Aufrechterhaltung der Funktionalität bei gleichzeitiger Akkumulation von Mutationen) wird als stabilisierende Selektion bezeichnet. Die Theorie der stabilisierenden Selektion besagt, dass Mutationen in einem Enhancer-Element angehäuft werden können, solange das Expressionsmuster des regulierten Gens konstant bleibt. Dies ist der z.B. Fall, wenn die auftretenden Mutationen fast neutral sind und aufgrund genetischer Drift im Genom fixiert werden. Durch die modulare Struktur hat eine Mutation innerhalb einer Bindestelle häufig keine gravierenden Auswirkungen auf die Gesamtfunktion des Enhancers und kann durch eine adaptive Mutation ausgeglichen werden. Dies führt zu einer relativ hohen Mutationsrate der cis-regulatorische Elemente (trotz ihrer immense funktionellen Relevanz für den Organismus) und zu einem Turn-over von Bindestellen innerhalb der Enhancer, bei dem beständig Bindestellen verloren gehen oder hinzugewonnen werden. Begünstigt wird dies dadurch, dass die Transkriptionsfaktorbindestellen kurze DNA-Sequenzen umfassen und somit die Wahrscheinlichkeit für die zufällige Entstehung einer Bindestelle relativ hoch ist (Dermitzakis et al., 2003). Durch Sequenzvergleiche cis-regulatorischer Elemente von Genen der Segmentierungskaskade zwischen *D. melanogaster*, *D. virilis* und *D. pseudoobscura* wurde ermittelt, dass im Schnitt 0.94% der Bindestelle pro Millionen Jahre dazu gewonnen werden oder verloren gehen. Bei einer evolutionären Distanz von 25 Mio. Jahren zwischen *D. pseudoobscura* und *D. melanogaster* (Russo et al., 1995) bedeutet dies, dass 23.5% der Bindestellen innerhalb des *D. melanogaster*-Genoms bei *D. pseudoobscura* nicht vorhanden sind. Von den in beiden Spezies

vorhandenen Bindestellen sind 30.8% vollständig konserviert. Der Sequenzvergleich von *D. melanogaster* und *D. virilis* liefert unter Berücksichtigung einer evolutionären Distanz von 40 Mio. Jahren ähnliche Werte. Hier sind 19.2% der Bindestellen vollständig konserviert während 37.5% der Bindestellen nicht mehr identifiziert werden können. Die identischen Bindestellen sind zum größten Teil (17 von 20) auch in *D. pseudoobscura* vollständig konserviert, was dafür spricht das diese Bindestellen unter einem erhöhten evolutionären Druck stehen und die Evolutionsgeschwindigkeit unterschiedlicher Bindestellen variiert (Costas et al., 2003). Die relativ hohe Evolutionsgeschwindigkeit von Transkriptionsfaktorbindestellen wird durch im Rahmen des *D. pseudoobscura*-Genom-Projekts durchgeführte Sequenzvergleiche mit *D. melanogaster* bestätigt. Hier wurde gezeigt, dass im Bereich bekannter Bindestellen die Sequenzkonservierung überdurchschnittlich häufig 80% und mehr beträgt, jedoch auch zahlreiche schlechter konservierte Bindestelle existieren und der Mittelwert des Konservierungsgrad nur relativ geringfügig über der Konservierung nahe gelegener nicht funktionaler Sequenzen liegt (Richards et al., 2005).

Ein ähnliches Verhalten cis-regulatorischer Sequenzen wurde im Vertebratensystem ermittelt. Zahlreiche cis-regulatorische Elemente zeigen einen hohen Turn- over der ähnlichen evolutionären Mechanismen wie in der *Drosophiliden*- Evolution folgt. Dies gilt jedoch nicht für alle Bindestellen im gleichen Ausmaß, da es auch hier ähnlich wie im *Drosophiliden*-System Cis-Regulatoren gibt die eine stärkere Konservierung aufweisen (Dermitzakis and Clark, 2002).

Haben sich die Enhancer homologer Gene im Verlaufe der Evolution noch weiter auseinander entwickelt kann beobachtet werden, dass es zu einer Co-Evolution von cis-regulatorischen Elementen und trans-regulatorischen Faktoren kommt. Dies hat zur Folge, dass Enhancer aus einer Spezies in einer weit entfernt verwandten Spezies nicht mehr funktional sind obwohl das Zielgen in homologen Geweben exprimiert wird und die Expression über homologe Mechanismen gesteuert wird. Dies wurde z.B. anhand der Expression der orthologen Gene *unc-30* bzw. *ptx-1* aus *C. elegans* bzw. *D. melanogaster* (evolutionäre Distanz ca. 530 Mio. Jahre) gezeigt. Obwohl die orthologen Gene im gleichen Gewebe über konservierte Mechanismen aktiviert werden ist der *D. melanogaster* *ptx-1*-Enhancer nicht in der Lage eine *unc-30* ähnliche Reporter-gen-Expression in *C. elegans* zu steuern. In diesem Fall hat die Co-Evolution von cis-regulatorischer DNA-Sequenz und trans-aktivierenden Proteinen dazu geführt, dass der *Drosophiliden*- Enhancer in *C. elegans* nicht mehr

korrekt erkannt wird. In dem Modell der Co-Evolution von cis-Regulatoren und transaktivierenden Proteinen geht man aufgrund des hohen Turn-overs von dem „Reshuffling“ von Bindestellen innerhalb eines Enhancers aus; d.h. es verändert sich hauptsächlich die Position der Bindestellen innerhalb eines Enhancers, die funktionale Sequenz bleibt jedoch ähnlich. Ausgeglichen wird das „Reshuffling“ durch die Co-Evolution der Transkriptionsfaktoren, wobei die Proteininteraktionsdomänen schneller evolvieren als die DNA-Bindedomäne. Die Konservierung der Genexpression über lange Zeiträume bei schnell evolvierenden Enhancern beruht auf der Konservierung der Interaktionen von unterschiedlichen an der Expression eines Gens beteiligten Transkriptionsfaktoren.

Auch beim Vergleich von *D. melanogaster* und *C. elegans* zeigt sich, dass nicht alle Enhancer mit der gleichen Geschwindigkeit evolvieren und dass bei einigen Enhancern die Erkennung der DNA-Bindestelle auch über eine große evolutionäre Distanz gewährleistet ist. Ein Beispiel hierfür ist der herzspezifische Enhancer des *mef2*-Gens. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Enhancer mit relativ wenigen einzelnen Transkriptionsfaktorbindestellen (Ruvinsky and Ruvkun, 2003).

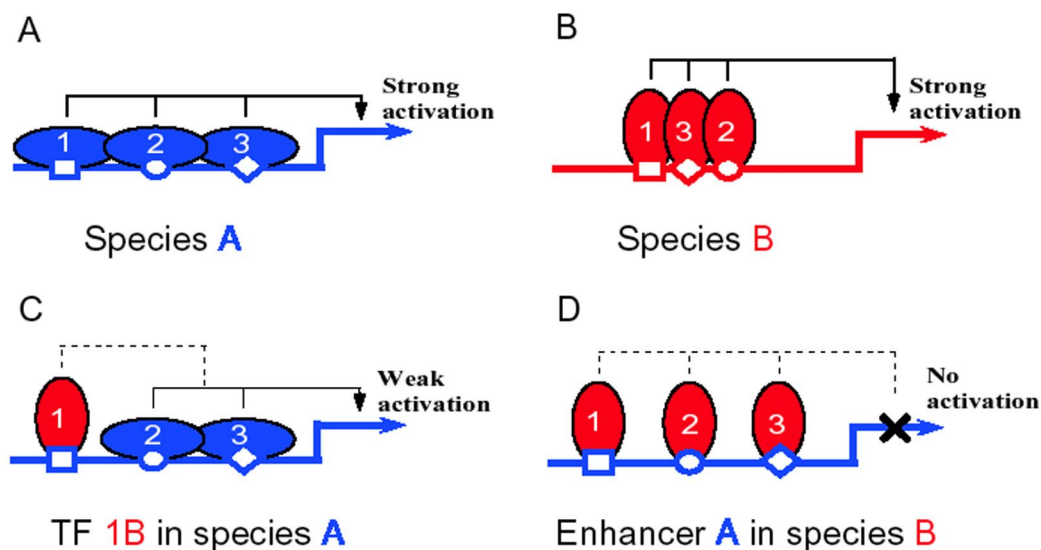


Abb.1.8 aus Ruvinsky and Ruvkun, 2003. Aufgrund des Reshuffling von Transkriptionsfaktor Bindestellen und der Co-Evolution von Enhancern sind die Transkriptionsfaktoren der Spezies B (B) nicht mehr in der Lage die Genexpression über die Transkriptionsfaktorbindestellen des in Spezies A vorhandenen Enhancers (A) zu aktivieren (D) bzw. die Kombination von Transkriptionsfaktoren aus beiden Spezies führt aufgrund mangelnder Interaktion nur zu einer schwachen Aktivität des Enhancers (C).

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Um einen korrekten Ablauf der Myoblastenfusion zu gewährleisten, muss nicht nur die Funktionalität aller beteiligten Proteine gegeben sein, sondern die Expression dieser Proteine muss zum richtigen Zeitpunkt und in den mesodermalen Derivaten die zur Muskulatur differenzieren erfolgen. Dies gilt auch für das *rolling pebbles*-Gen, dessen Transkript *rols7* in den Founder- und Precursorzellen des Mesoderms von Stadium 10 bis ca. Stadium 14 für die Myogenese essentiell ist. Innerhalb dieser Arbeit sollten nun cis-regulatorische Elemente und transregulatorische Faktoren analysiert werden die diese Regulation vermitteln. Da das *rols*-Gen für ein weiteres nicht mesodermal exprimiertes Transkript (*rols6*) codiert sollte hierbei der *rols7* spezifische Promotor mit den Komponenten Core-Promoter und viszerale und somatische Enhancern charakterisiert werden.

Da die Komponenten der genetischen Regulation wie Transkriptionsfaktoren und Enhancer auf funktionalem Niveau z.T. über große evolutionäre Distanzen konserviert kann ist z.B. der Vergleich von eventuell konservierten genspezifischen Enhancern einer anderen Spezies zur Identifikation von Transkriptionsfaktorbindestellen hilfreich sein. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der evolutionäre Vergleich des *rols7* und des *rols6*-Promotors durch Sequenzvergleiche von *D. melanogaster* mit *D. pseudoobscura*.

Zur Einordnung der *Rols7*-Expression in eine der Signalkaskaden die der Determination und der Differenzierung der somatischen Muskulatur bei *D. melanogaster* dienen, war die Identifikation von transregulatorischen Faktoren die an die erforderlichen cis-Regulatoren binden über Techniken wie den Yeast-One-Hybrid-Screen und den Binding-Site-Screen eine weitere wichtige Zielsetzung. Parallel erfolgte die Analyse von Mutanten möglicher Kandidatengene auf ihren Einfluss auf die *rols7*-Transkription.

Auch wenn schon zahlreiche Proteine beschrieben werden konnten, die in der Myoblastenfusion beteiligt sind, wurde bisher kein Modell zum Ablauf der Membranfusion erstellt und dieses in Beziehung zum Ablauf anderer extra- und intrazellulärer Membranfusionen gesetzt. Die Erstellung solches Modells anhand der Analyse der subzellulären Verteilung der fusionsrelevanten Proteine Duf/Kirre, Sns und *Rols7* und die Untersuchung der Auswirkung von Mutationen in verschiedenen myogeneserelevanten Genen auf diese Lokalisation unter Berücksichtigung der bisher

bekannten ultrastrukturellen Daten war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Besonders berücksichtigt werden sollte dabei auch die Möglichkeit der funktionalen Konservierung essentieller Proteine im eukaryotischen System

2. Material

2.1 Geräte

| | |
|---------------------------|--|
| Apotom | Zeiss |
| Elektrophoreseapparaturen | Werkstatt MPI Martinsried und Werkstatt Universität Marburg, Biometra |
| Digitalkamera | Polaroid |
| Fotomikroskop | Axiophot, Zeiss |
| Kryobad | KH-3, Biometra |
| Kühlzentrifuge | Megafuge 1.0 R, Heraeus Biofuge fresco, Heraeus |
| Magnetrührer | Mono, Variomag Monotherm, Variomag |
| PCR-Maschinen | Personal Cyclor, Biometra Master Cyclor personal, Eppendorf GPRT 1400 A, Greisinger electronic Ultrospec 3000 Pharmacia |
| pH-Meter | Reax 2000, Heidolph |
| Photometer | Rocky 3 D, Fröbel Labortechnik |
| Reaktionsgefäßschüttler | Power Pac 300, Biorad |
| Rundschüttler | Stemi SV, Zeiss |
| Spannungsquelle | Biofuge pico, Heraeus |
| Stereomikroskop | HBT 130, HCL |
| Tischzentrifugen | TI 1, Biometra |
| Thermoblock | UV-Stratalink TM 2400, Stratagene |
| Transilluminator | Savant SVC 199 H |
| UV-Crosslinker | Biotech-Fischer |
| Vakuumzentrifuge | MAGV, Rabenau, Londorf |
| Videokamera und -printer | WTC, Binder |
| Vortex-Gerät | C1, Haake |
| Wärme-Schrank | C10, Haake |
| Wärme-Wasserbad | |

2.2 Chemikalien

| | |
|---|---------------------------------|
| Agar-Agar | Invitrogen, Karlsruhe |
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| Adenosintriphosphat (ATP) | Boehringer, Mannheim |
| Agarose | Biozym, Hess. Oldenburg |
| Ammoniumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| 3-Amino-1,2,4,-triazol | Sigma, Deisendorf |
| Bacto-Trypton | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-thiogalactosid (X-Gal) | Roth, Karlsruhe |
| Dan Klorix (Natriumhypochlorid) | Colgate Palmolive GmbH, Hamburg |
| 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) | Sigma, Deisenhofen |
| DDSA | Fluka, Neu-Ulm |
| DMP | Fluka, Neu-Ulm |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) | Roth, Karlsruhe |
| Epoxydeinbettungsmittel | Fluka, Neu-Ulm |
| Formaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | Roth, Darmstadt |
| Heptan | Fluka, Neu-Ulm |
| Histidine | Sigma, Steinheim |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Leucine | Sigma, Steinheim |
| Lithiumacetat | Sigma, Steinheim |
| Nickelchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| MNA | Fluka, Neu-Ulm |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|--------------------------------|
| Octophenolpolyethylenglycolether (Triton X-100) | Serva, Heidelberg |
| Phalloidin-TRITC | Sigma, Steinheim |
| Polyethylenglycol 3350 (PEG) | Sigma, Steinheim |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) | Sigma, Deisenhofen |
| SD Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids and Ammoniumsulfate | Becton & Dickinson, Heidelberg |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Tryptophan | Sigma, Steinheim |
| Uracil | Sigma, Steinheim |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |
| YEPD Broth (Hefe-Vollmedium) | Invitrogen/Gibco, Karlsruhe |
| Yeast Synthetic Drop-Out Medium Supplement w/o Histidin, Leucin, Tryptophan and Uracil | Sigma, Steinheim |

2.3 Enzyme

| | |
|---|---|
| Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Restriktionsendonucleasen | Amersham Pharmacia Biotechs, Freiburg Roche, Mannheim New England Biolabs |
| Taq DNA Polymerase | Peqlab, Erlangen Quiagen, Hilden |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |
| Vent DNA Polymerase | New England Biolabs |

2.4 Fertige Reagentsätze

| | |
|--|--|
| Elutip-D | Schleicher & Schüll, Dassel |
| GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit | Pharmacia, Freiburg |
| Individual Indirect Tyramide Reagent Pack | PerkerElmer Life Science, Inc., Boston |
| Jet Star Kit | Genomed, Bad Oeynhausen |
| MATCHMAKER One-Hybrid System | Clontech |
| PCR-Kit | Quiagen, Hilden |
| Vectastain Elite ABC Standard Kit | Vector Laboratories, Burlinggame |
| TOPO-TA Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe |

2.5 Antikörper und Seren

| | |
|--|----------------------------------|
| Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment | Boehringer, Mannheim |
| Anti-Duf/Kirre, polyklonal, Kaninchen | K. F. Fischbach, Freiburg |
| Anti-eIF3-S10 (anti-p170) Polyklonal, Kaninchen | Shanina et al., 2001 |
| Anti-FasciclinIII Monoklonal, Maus | Patel et al., 1987 |
| Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidasegekoppelt | Vector Laboratories, Burlinggame |
| Anti-Mouse-IgG, Peroxidase-gekoppelt | Vector Laboratories, Burlinggame |
| Anti-Rols7 polyklonal, Maus | Menon und Chia, 2001 |
| Anti-Rolo2 polyklonal, Kaninchen | Pineda, Berlin |
| Anti-Sns polyklonal, Kaninchen | K.F. Fischbach, Freiburg |
| Anti-Titin | Machado et al., 1998 |
| Anti-β3-Tubulin | Leiss et al., 1988 |

| | |
|---|---|
| polyklonal, Kaninchen | |
| Anti- β -Galaktosidase Antikörper | Cappel |
| polyklonal, Kaninchen | |
| Anti- β -Galaktosidase Antikörper | Promega, Mannheim |
| monoklonal, Maus | |
| Anti- β_{PS} -Integrin | Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa, USA |
| goat-Serum | Vector Laboratories, Burlingame |
| horse-Serum | Vector Laboratories, Burlingame |

2.6 Synthetische Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz 5'-3' |
|------------------|---|
| 5' AD Amplimer | CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C |
| β TubPo3' | TAT TAC TAG TCA GTC GAA CAC AAC ACA A |
| β 1TubPo5N | TAT ACC GCG GCC ATC GTA TAA AAG CCC G |
| Dvbcd 3 | TTC GGC TGA TAA TGG CAG GCC AA |
| Dvbcd 5 | TAA TGC AAG CGT ATA ATC CGC ATC G |
| Dvsev 3 | AAG CAT GCC GCT TGC TTG CCT AGC A |
| Dvsev 5 | GAG CTG CAT AAA TTC AGC TGA TAG A |
| Dvtub 3 | TCC AAG CTG ATG TGC GCT GCA GGT |
| Dvtub5 | ACG CTC GCT CGT AGT TAA GCT AAA G |
| LDI-14 | CCA CCA ATC GCT ATG CGA GC |
| LDI-20 | CTT CAG GTT GTG ATT GCT CAC G |
| MEBOX | CAT AGA ATT CAG GTA CAG TCA CCG |
| OEBOX | CGA CGA ATT CTT ATT ATT GAT CAT TG |
| OETSB | GAT CGA ATT CTC TAA CAA AAG TGA TGG ACC GGC GC |
| OHS3' | GGG ATC CAA GAG CCA AAG ACG GGG CTT AGT CGC GGG TGC AGA ACG TGC AGT CAG CGC CGG TCC ATC ACT TTT GTT AGA G |
| OHS5' | AAT TCT CTA ACA AAA GTG ATG GAC CGG CGC TGA CTG CAC GTT CTG CAC CCG CGA CTA AGC |

| | |
|--------------|--|
| | CCC GTC TTT GGC TCT TGG ATC CC |
| OHS_primer1 | GGG ATC CAA GAG CCA AAG ACG GGG CTA |
| pChabΔSal3' | TTG CTG GTG TCC AGA CCA ATG CCT |
| pChabΔSal7 | GTT CAA TGA TGT CCA G |
| Pelic3 | CTC TAT TTA TAC TCC GGC GCT C |
| Pelic5 | ACC TTT AGC CGA TCA ATT GTG CTC |
| pHis3 | GGA CAC CAA ATA TGG CGA TCT CGG |
| PLacZ3 | CAC CAC GCT CAT CGA TAA TTT CAC C |
| Pseudo 3' | TCA GAC TAG TGT TGT TGC TTG TTG AGG ATC |
| RMEFP NEU | GAT CGA ATT CAC GTT CTG CAC CCG CGA CTA TTT |
| RoEx1-3' neu | CTA TAC TAG TCC ATC GCG AGC GCA ATT T |
| Rols7.2.1 | TAT CGT AGG CAT GTG GAA TG |
| rolsdex1 | TCA GAC TAG TAC AGT GGA TGT TTA ACA ATA |
| rolsdex2 | TCA GAC TAG TTA ATC CAA TGT GGC AAT T |
| rolsdex3 | TAT ACC GCG GAG ACG AGC GGA TTG C |
| RolsLDI 14 | CCA CCA TCG CTA TGC GAG C |
| RolsLDI 20 | CTT CAG GTT GTG ATT GCT CAC G |
| ROPO 1 | TGA CGA ATT CGC CTC ACT TCT GAT ATT |
| ROPO 1invers | GGG ATC CAA TAT CAG AAG TGA GGC |
| ROPO 1Inlr | TGG AAT ATC AGA AGT GAG GC |
| ROPO 2 | TGA CGA ATT CTC GTC TAG TTA GCA TTG |
| ROPOH | ATC TGA ATT CGG CAA CGC AGC TCT G |
| ROPOHR | ATC TGA ATT CCA GAG CTG CGT TGC C |
| ROPRD | ACG TGA ATT CGT CGC ACG GTG GAA AGT GG |
| ROPRDII | CAT GGA ATT CGT CCG ACA GCC AAG ATC GCA GTG |
| ROPRIU | TCA GAC TAG TCC TCT GCT TGT ACA AGA TG |
| ROPRIUin | GAT CGA ATT CCA TCT TGT ACA AGC AGA GG |
| ROPRIU IR | TCC TCT GCT TGT ACA AGA TG |
| ROSH2ps3'neu | AGA TAC TAG TGT ACG ATT GAT CGC GTT T |
| ROSH1A ps5' | CGA CGA ATT CTC GAG CGA TTA CAA ACC A |
| TRASTA 1 | GTT GCC GTC AGC TCG GCA A |
| TRASTA 2 | GGC AAT CCG CTC GTC TCA AT |

| | |
|----------|-----------------------------|
| TRASTA 3 | ATT GCA TTC CAA CGC GCG T |
| β3aa23 | ATC ATT TCC GAG GAG CAC GGC |
| β3aa140 | GCC CAG CGA GTG CGT CAA |

2.7 Bakterienstämme

| | |
|-------------------------|---|
| <i>E.coli</i> DH5α | supE44, ΔlacU 169 (Φ80lacZΔM15), hsdR 17, recA 1, endA 1, gyrA 96, thi-1, relA1 |
| <i>E.coli</i> LE 392 | E14 ⁻ (MrcA ⁻), hsdR514, sup E44, sup F58, lacY1 or Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55 |
| <i>E.coli</i> TOP10 | Invitrogen, Karlsruhe |
| <i>E.coli</i> XL-1 blue | recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, sup E44, relA1, Lac [F'proAB lacI ^q , ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] |

2.8 Hefestamm

| | |
|--------|---|
| YM4271 | MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2- 801, leu2-3, 112, tpr1-901, tyr1-501, gal4- Δ512, gal80-Δ538, ade5::hisG |
|--------|---|

2.9 Plasmide

| | |
|-----------------|--|
| LambdaFIXII“PY“ | Phage mit genomischem <i>rolS</i> - Insert; Rau A., Dissertation 2001 |
| pBlueskriptIIKS | Klonierungsvektor, (Stratagene, Heidelberg) |
| pChabΔSal | Thummel et al., 1988 |

| | |
|------------------|---|
| pChabHsp43 | Thummel et al., 1988 |
| pCRII-TOPO Blunt | Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe |
| pCRII-TOPO TA | Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe |
| pHisi | Transformationsvektor für Hefen; Matchmaker One- Hybrid System User Manual |
| pHisi-1 | Transformationsvektor für Hefen; Matchmaker One- Hybrid System User Manual |
| pLaczi | Transformationsvektor für Hefen; Matchmaker One- Hybrid System User Manual |
| PH-Pelican | Barolo et al., 2000 |

2.10 Genbanken

| | |
|--|---|
| <i>D. melanogaster</i> LDcDNA Bank (Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project/EST-Project) | Embryonen 0-24h, Inserts über EcoRI-(5') und XhoI-(3') Insertionsstelle des Blueskript-Vektors SK in den Uni-ZAP XR Vektor kloniert; <i>in vivo</i> Exzision der cDNA möglich. Bank generiert von Jing Hong |
| <i>D. melanogaster</i> Matchmaker cDNA Library | Embryonen 0-18h, oligo(dT) + random primed; über EcoRI in pGAD10 kloniert (Clontech) |

2.11 Fliegenstämme

| | |
|--------|---|
| AD328 | <i>RoIs</i> ^{AD328} /TDLZ (Rau et al., 2001) |
| BL 447 | Df(2R)stan1,P{ry[+t7.2]=neoFRT}42Dcn[1]s p[1]/CyO; Bloomington Stock Center |
| BL 567 | Df(2L)pr-A16, cn[1]bw[1]/CyO Bloomington Stock Center |

| | |
|---------------------------------|--|
| BL 861 | <i>pnt</i> ^{Δ88} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Bloomington Stock Center |
| BL 1467 | Df(3R)P115, <i>e</i> [11]/TM1; DP(3;1)P115/+ Bloomington Stock Center |
| BL 1671 | <i>red</i> ¹ <i>e</i> ¹ <i>mbc</i> ^{C1} /TM3, P{ <i>ftz-lacZ.ry</i> ⁺ }TM3, <i>Sb</i> ¹ <i>ry</i> Bloomington Stock Center |
| BL 2222 | <i>ru</i> ¹ <i>h</i> ¹ <i>th</i> ¹ <i>st</i> ¹ <i>cu</i> ¹ <i>sr</i> ¹ <i>e</i> ^s <i>pnt</i> ² <i>ca</i> ¹ /TM3, <i>Sb</i> ¹ <i>Ser</i> ¹ ; Bloomington Stock Center |
| BL 2577 | Df(3L)emc-E12/TM6B, <i>Tb</i> ¹ <i>ca</i> ¹ , Bloomington Stock Center |
| BL 3101 | <i>aop</i> ¹ <i>cn</i> ¹ <i>bw</i> ¹ <i>sp</i> ¹ /CyO Bloomington Stock Center |
| BL 5492 | Df(3L)eyg[C1]/TM3, P{ <i>ftz/lacC</i> }SC1, <i>ry</i> ^{RK} <i>Sb</i> ¹ <i>Ser</i> ¹ |
| BL 5602 | <i>D</i> ^{B2} /TM6C, <i>Sb</i> ¹ , Bloomington Stock Center |
| BL6677 | <i>Y</i> ¹ <i>w</i> [*] ; <i>Rac</i> 1 ^{J11} <i>Rac</i> 2 ^Δ P{FRT(<i>w</i> ^{hs})}2A/TM6B, <i>Tb</i> ¹ |
| BL10984 | P{PZ} <i>jing</i> ⁰¹⁰⁹⁴ <i>cn</i> ¹ /Cy=, <i>ry</i> ⁵⁰⁶ |
| BL 15728 | P{Epgy2}eIF3-S10 ^{EY04209} /TM3, <i>Sb</i> ¹ , <i>Ser</i> ¹ |
| <i>blow</i> ² | <i>blow</i> ² /CyO, <i>lacZ</i> ; Bloomington Stock Center |
| If/CyOhglacZ | Balancerstamm für das III. Chromosom |
| Df(3L)ED4457 | Df(3L)ED4457/TM2, <i>Ubx</i> ; Szeged Stock center |
| Df(2R)Exel7123 | <i>W</i> ¹¹¹⁸ , Df(2R)Exel7123, P+PBac{XP5.WH5}Exel7123; Bloomington Stock Center |
| <i>Dmef</i> ²²⁻²¹ | <i>Dmef</i> ²²⁻²¹ /CyO(<i>wglacZ</i>) (Bour et al., 1995) |
| Dr/TDLZ | Balancerstamm für das II. Chromosom |
| <i>Drosophila pseudoobscura</i> | Wildtyp |
| EP(3)3330*5a | EP(3)3330*5a <i>ro/s6</i> - spezifische Allel (Dissertation Pütz, 2004) |
| <i>kette</i> ^{j4-48} | <i>kette</i> ^{j4-48} /TM3 (Hummel et al., 2000) |
| <i>lameduck</i> ² | <i>lameduck</i> ² /TDLZ, EMS-Allel (Duan et al., 2001) |
| OregonR | Wildtyp |
| <i>pnt</i> ^{3D2-026} | <i>pnt</i> ^{3D2-026} /TDLZ (Menne et al., 1997) |

| | |
|----------------------------|--|
| <i>schizo</i> | <i>Schizo</i> ^{C1-028} /TDLZ (Hummel et al., 1999) |
| <i>sns 20</i> ² | <i>sns20</i> ² /CyOhg/lacZ (Paululat al., 1995) |
| U54650 | Df(3L)BK9/TM3, <i>y⁺ri¹p¹Sb¹Ubx^{bx-34e}e^s</i> Umea Stock Center |
| white | <i>w-/w-</i> |

2.12 Internet- Server

McPromoter MM:II The Markov <http://genes.mit.edu/McPromoter.html>

Chain Promoter Prediction Server

NCBI BLAST species <http://species.flybase.net/blast/>

BLASTN 2.2.6

TFSearch <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

rVista 2.0 <http://rvista.dcode.org/>

VISTA Browser <http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2?bg=dm1>

VISTA tracks on UCSC Browser

zPicture : dynamic blastz alignment <http://zpicture.dcode.org/>

visualization tool

3. Methoden

3.1 Drosophila-Zucht

Die Zucht von *Drosophila melanogaster* erfolgt in Klimakammern bei 18°C oder bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70%. Zur Ernährung der Larven dient ein Zuchtmedium, bestehend aus:

| | | |
|-------|----|----------------------------|
| 90 | g | Agar |
| 1 | kg | Maismehl |
| 180 | g | Trockenhefe |
| 1 | kg | Malzextrakt |
| 230 | g | Zuckerrübensirup |
| 120 | ml | 20% Nipagin in 70% Ethanol |
| 360 | ml | 20% Propionsäure |
| ad 12 | l | In Wasser |

Mit diesem Medium werden zylindrische Kunststoffgefäße ca. 2 cm hoch befüllt. Zum Verschließen der Gefäße dienen luftdurchlässige Ceparenstopfen. Zur Ernährung der adulten Fliegen wird das Zuchtmedium zusätzlich mit Trockenhefe bestreut. Die Fliegen werden in Abhängigkeit von ihrer Generationszeit (abhängig von der Umgebungstemperatur) alle 3-7 Tage auf neue Zuchtflaschen gesetzt.

3.2 Gewinnung von *Drosophila*-Embryonen

Zur Gewinnung von *Drosophila*-Embryonen werden 200-300 Fliegen in leere, an einer Seite mit Drahtnetzchen verschlossene Kunststoffgefäße gesetzt. Diese Gefäße werden auf Apfel- bzw. Traubensaftagarschalen gestülpt, welche zur Ernährung der Fliegen mit in Wasser angerührter Hefe bestrichen sind. Sollen weniger Fliegen zur Gewinnung der Embryonen eingesetzt werden, werden zylindrische Kunststoffgefäße mit Apfel- bzw. Traubensaftagar befüllt und mit luftdurchlässigen Ceparenstopfen verschlossen. Diese Schalen bzw. Flaschen

werden in Intervallen von 4-16 Stunden gewechselt. Um die gewünschte Entwicklungsstufe der Embryonen zu erreichen, werden die Ablagen bis zu 12 h bei 18°C oder bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Entwicklung der Embryonen bei 4°C im Kühlschrank abgestoppt.

Der Apfelsaftagar setzt sich zusammen aus:

| | | |
|------|----|-----------|
| 375 | ml | A. dest |
| 13,5 | g | Agar |
| 6,25 | g | Zucker |
| 1 | g | Nipagin |
| 125 | ml | Apfelsaft |

3.3 Immunhistochemische Färbungen von *Drosophila*- Embryonen

(Lawrence and Johnston, 1989)

3.3.1 Fixierung

Zunächst werden die Eier mit Hilfe eines Pinsels von den Apfelsaftschälchen gesammelt, in Drahtnetzchen überführt und mit 0.7% NaCl + 0.01% Triton X100 mehrfach gewaschen. Zur Entfernung des Chorions wird 50% Hypochloridlösung (Dan-Klorix) verwendet. Der Dechorionisierungsgrad wird mittels Binokular beobachtet; nach der vollständigen Entfernung des Chorions wird mehrfach mit 0.7% NaCl + 0.01% Triton X100 gewaschen.

Anschließend erfolgt die Fixierung der Embryonen durch Formaldehyd oder alternativ durch Erhitzung.

Bei der Fixierung durch Formaldehyd werden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und je 500 µl Heptan und 500 µl 4% Paraformaldehyd/PBS zugegeben und für 15-20 min unter ständiger Bewegung auf einem Rundschüttler fixiert. Nach der Entfernung der Fixierlösung werden die Embryonen dreimal mit je 1 ml Heptan gewaschen. Im nächsten Schritt wird die Vittelmembran entfernt; dies wird durch Zugabe von 500 µl Heptan und 500 µl Methanol und kräftiges Schütteln für 2-3 min erreicht. Abschließend wird 3 x mit Methanol gewaschen.

Bei der Fixierung durch Erhitzen werden die Embryonen in den Drahtnetzchen in eine Schale mit kochender PBT-Lösung (Wasserbad) überführt und für 10 sec erhitzt, anschließend werden die Embryonen sofort in eine Schale mit eiskaltem PBT gestellt (Eisbad). Danach werden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, die Vitellinmembran entfernt (s. oben) und mit Methanol gewaschen.

Eine weitere Fixierungsmöglichkeit ist die „Methanolfixierung“- hierbei werden die Embryonen nach dem Dechorionisieren lediglich in 500 µl Heptan und 500 µl Methanol devittelinisiert und mit Methanol gewaschen.

Nach erfolgter Fixierung können die Embryonen in Methanol für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

| 1 x PBS | | | 1 x PBT | |
|---------|--------|----------------------------------|---------|----------|
| 130 | mmol/l | NaCl | 1 x | PBS |
| 7 | mmol/l | Na ₂ HPO ₄ | 0.1% | Tween 20 |
| 3 | mmol/l | NaH ₂ PO ₄ | | |

3.3.2 Devitellinisierung der Embryonen von Hand

Bei einigen Färbemethoden, wie z.B. dem Nachweis von F-Aktin durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin, dürfen die verwendeten Embryonen nicht mit Methanol in Kontakt kommen. Für einen solchen Nachweis müssen die Embryonen handdevittelinisiert werden. Dazu werden die Embryonen zunächst wie in Punkt 3.3.1 beschrieben fixiert und in Heptan gewaschen. Gleichzeitig wird der Boden eines schwarzen Blockschälchens mit Heptankleber (s. Punkt 3.18.2) beschichtet. Bewährt haben sich drei Schichten, die jeweils gut trocknen müssen. Anschließend werden einige Embryonen aus dem Heptan in das Blockschälchen auf den Heptankleber überführt. Nach dem Verdampfen des Heptans (der Kleber muss wieder trocken werden) werden die Embryonen rasch mit PBS überschichtet (die Embryonen selbst dürfen nicht anfangen zu trocknen). Anschließend wird die Vitellinmembran unter dem Binokular mit einer scharfen Glasnadel geöffnet und die Embryonen mit der Pipette in ein Reaktionsgefäß mit PBT überführt.

3.3.3 Antikörperfärbung

Zunächst wird das Methanol von den Embryonen abgezogen und die Embryonen auf dem Rundschüttler 3 x für 20 min in PBT gewaschen. Danach wird der Erstantikörper in geeigneter Verdünnung (in PBT) auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird zunächst 3 x 5 min mit PBT gewaschen und dann, um die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers zu minimieren, mit 2% Serum in PBT für 1 h geblockt. Das Serum stammt immer von dem Organismus, in dem der Zweitantikörper hergestellt wurde. Im Anschluss wird der Zweitantikörper aufpipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Zweitantikörper wird vor der Verwendung in PBT 1:20 verdünnt und auf *Drosophila*- Embryonen für mindestens 1 h präadsorbiert. Nach der Entfernung des Zweitantikörpers wird 4 x 10 min mit PBT gewaschen. Bei der Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers erfolgt die Zweitantikörperinkubation und die Waschschrte unter Lichtabschluss und die Embryonen werden direkt anschließend in ca. 80 µl Fluoromount eingebettet. Bei Verwendung von biotinylierten Zweitantikörpern wird während der Waschrte nach der Zweitantikörperinkubation der AB-Komplex vorbereitet (4µl Avidin und 4 µl biotinylierte Peroxidase in 250 µl PBT) und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wird diese Lösung auf die Embryonen gegeben und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird 3 x 10 min in PBT gewaschen.

Für die Färbereaktion werden die Embryonen in 600 µl PBT in silikonisierte Blockschälchen überführt und 10 µl Diaminobenzedin, 5 µl H₂O₂ und 2 µl 10% Nickelchlorid zugesetzt. Nach Erreichen des gewünschten Färbegrads wird die Färbelösung von den Embryonen abgezogen und die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt.

Zeigt die oben beschriebene Methode nur eine sehr schwache Färbereaktion besteht die Möglichkeit die Intensität der Färbung durch die Verwendung des TSA-Amplification Kits zu verstärken. Hierzu wird nach der Inkubation mit dem AB-Komplex 4 x 10 min gewaschen und anschließend die BT Working Solution (147 µl Amplication Diluent + 3 µl Biotinyl Tyramide Reagent) aus dem TSA Amplification Kit zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rundschüttler inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wird 4 x 10 min gewaschen und darauf folgend mit

der AB-Lösung für 30 min inkubiert. Nach den abschließenden Waschschritten (4 x 10 min) erfolgte die Färbung wie oben beschrieben.

3.3.4 Nachweis von F-Aktin durch Phalloidin

Zum Nachweis von F-Aktin wurde TRITC gekoppeltes Phalloidin verwendet. Dazu werden die Embryonen zunächst handdevitellinsiert und mehrfach in PBT gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Färbung mit 1: 1000 verdünntem TRITC gekoppelten Phalloidin für 10 min bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen (3 x 10 min) in PBT werden die Embryonen in Fluoromount eingebettet oder für eine anschließende Antikörperfärbung eingesetzt.

3.3.5 Einbettung der Embryonen in Epon

Zunächst werden die Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu werden die Embryonen in 40%, 70% und 96% Alkohol für je 2 x 5 min gewaschen. Danach werden die Embryonen auf einen Objektträger transferiert und mit wenigen Tropfen Epon bedeckt. Nach Auflage des Deckglases erfolgt die Polymerisation des Epons für 48 h bei 60°C.

Zur Einbettung und Ausrichtung von einzelnen Embryonen wird nach dem letzten Waschschriff der 96% Alkohol entfernt und durch eine Mischung von 50% Epon in Alkohol ersetzt. Darin werden die Embryonen über Nacht imprägniert. Am nächsten Tag werden die Embryonen in ein Blockschälchen überführt. Nach dem Abdampfen des Alkohols können die Embryonen einzeln auf einem Objektträger platziert und ausgerichtet werden. Nach einer Polymerisationszeit von 2-3 h bei 60°C wird die Ausrichtung der Embryonen kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Anschließend wird auf die Embryonen eine ausreichende Menge von Epon gegeben um alle Embryonen zu bedecken und ein Deckglas aufgelegt. Die Polymerisation erfolgt bei 60°C für 48 h.

Epon

| | | |
|------|---|----------|
| 36.5 | g | Epon 812 |
| 20 | g | DDSA |
| 13.4 | g | MNA |
| 1 | g | DMP |

3.4 *in situ*-Hybridisierung an Embryonen von *D. melanogaster*

(Tautz und Pfeifle, 1989)

3.4.1 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden mittels PCR-Reaktion

Zur Herstellung der DIG-markierten PCR-Sonden wird wie in Punkt 3.12 verfahren. Anstelle der dNTPs wurden 2 µl DIG DNA Labeling Mix eingesetzt.

3.4.2 Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription

Zur Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde verwendet man Vektoren mit Promotoren an denen die entsprechenden RNA-Polymerasen binden können, z.B. den Bluescript oder den pCRII TOPO TA-Vektor. Linearisiert man diesen Vektor durch einen 3' vom Promotor lokalisierten Schnitt kann mit Hilfe dieser Methode der Bereich 3' des Promotors bis zur Schnittstelle transkribiert werden. Ist in diesem Vektor ein Insert vorhanden, ist es durch eine entsprechende Wahl der Schnittstelle möglich, das Insert zu transkribieren und sowohl sense- als auch anti-sense Sonden herzustellen.

Zunächst werden 5 µg Plasmid-DNA linearisiert und anschließend gefällt. Für die *in vitro* Transkription wurde 1 µg DNA eingesetzt. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch 2 µl DIG RNA Labeling Mix, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 1 µl der entsprechenden RNA- Polymerase (T3-, T7- oder Sp6-Polymerase) und 0.2 µl RNase- Inhibitor zugesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 2h bei 37°C.

3.4.3 Spotttest der DIG- markierten Sonde

Von der Sonde wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) und je 1 µl von jeder Verdünnung auf eine Hybond N- Membran pipettiert; nach einer kurzen Trocknungszeit erfolgt die kovalente Bindung der DNA an die Membran mittels UV-Strahlung.

Dann wird die Membran zunächst für 1 min mit DIG 1 gewaschen, danach für 30 min mit DIG 2 geblockt. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper, hierfür wird der Antikörper 1:5000 mit DIG 2 verdünnt und die Membran

mit dieser Lösung für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wird die Membran 2 x 15 min mit DIG 1 gewaschen und anschließend 2 min in DIG 3 äquilibriert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Für die Färbung wird 3.5 µl NBT und 3.5 µl X-Phosphat in 1 ml DIG 3 verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Färbung erfolgt für 10 min im Dunkeln; die Färbung wird durch Waschen mit Wasser gestoppt.

| DIG 1 (10x) | | | DIG 2 | DIG 3 |
|-------------|-------|--------------|------------------|------------------------------------|
| 1 | mol/l | Tris/HCl | DIG 1 + 1% | 100 mmol/l Tris/HCl |
| 1.5 | mol/l | NaCl, pH 7.5 | Blocking-Reagenz | 100 mmol/l NaCl |
| | | | | 50 mmol/l MgCl ₂ pH 9.5 |

3.4.4 Vorbereitung der Embryonen

Zunächst werden die Embryonen dechorionisiert, fixiert und devittelinisiert (s. Punkt 3.3.1). Nach der Entfernung des Methanols werden die Embryonen zur Rehydrierung mehrfach kurz in PBT gewaschen, für 20 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und 3 x 10 min in PBT gewaschen.

3.4.5 Hybridisierung

Zunächst werden die Embryonen in 1 ml 50% Hybridisierungslösung/50% PBT für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend für 10 min in 1 ml Hybridisierungslösung. Im nächsten Schritt werden die Embryonen in 150 µl Hybridisierungslösung überführt und die Embryonen im Heizblock bei der Hybridisierungstemperatur (45- 55°C; abhängig von der verwendeten Sonde) für 1-6 h prähybridisiert. Im Anschluss wird die Sonde mit Hybridisierungslösung verdünnt (die geeignete Verdünnung wird mit einem Spotttest ermittelt) und 0.2-0.5 µl dieser Lösung auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei hybridisiert.

Hybridisierungslösung

| | | |
|-----|--------|--------------|
| 50 | ml | Formamid |
| 25 | ml | 20 x SSC |
| 0.1 | ml | 10% Tween 20 |
| ad. | 100 ml | A. dest |

3.4.6 DIG- Nachweis und Färbung der Embryonen

Nach der Hybridisierung werden die Embryonen für 3 x 20 min mit der Hybridisierungslösung bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Danach wird bei Raumtemperatur 1 x 20 min mit 60% Hybridisierungslösung/ 40% PBT und 1 x 20 min mit 20% Hybridisierungslösung/80% PBT gewaschen; im Anschluss erfolgen zwei 20 minütige Waschschrte in PBT. In dieser Zeit wird der Anti-DIG Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBT an Embryonen für mind. 1 h präadsorbiert.

Der präadsorbierte Antikörper wird in einer Endverdünnung von 1:2000 eingesetzt; die Inkubation der Embryonen mit diesem Antikörper erfolgt für mind. 1 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation werden die Embryonen 3-4 x für 20 min mit 1 ml PBT gewaschen.

Für die Färbung werden die Embryonen zunächst für 3 x 10 min mit 1ml Färbepuffer gewaschen. Danach werden 4.5 µl NBT und 3.5 µl X-Phosphat in 1 ml Färbelösung verdünnt und die Embryonen mit der Färbelösung versetzt. Die Färbung erfolgt unter Lichtabschluss. Nach dem Erreichen der gewünschten Färbeintensität wird die Färbelösung von den Embryonen abgenommen und die Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt.

Färbelösung

| | | |
|-----|-------|---------------------------|
| 0.6 | ml | 5 mol/l NaCl |
| 1.5 | ml | 1 mol/l MgCl ₂ |
| 3.0 | ml | 1 mol/l Tris/HCl pH 9.5 |
| 0.6 | ml | 50 mmol/l Levamisol |
| ad | 30 ml | A. dest |

3.5 Stammhaltung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt durch Animpfen von LB-Medium mit einer auf LB-Agar gewachsenen Einzelkolonie. Es wird bei 37°C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

| LB-Medium | | | LB-Agar | | |
|-----------|---|--------------|---------|---|--------------|
| 1 | % | Bactotrypton | 1 | % | Bactotrypton |
| 0.5 | % | Hefeextrakt | 0.5 | % | Hefeextrakt |
| 1 | % | NaCL | 1 | % | NaCl |
| | | | 1.5 | % | Agar |

Für eine längerfristige Stammhaltung werden 500 µl Flüssigbakterienkultur (in LB-Medium) mit 500 µl sterilem Glycerin (87%) gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Zellen bei –80°C gelagert.

Für eine kurzfristige Stammhaltung werden Verdünnungsausstriche der Flüssigkultur auf Platten mit LB-Agar durchgeführt. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Agar-Platten mit den Kolonien können bei 4°C für ca. 2 Monate gelagert werden.

Sollen Bakterien mit einem Plasmid für eine Antibiotikaresistenz selektioniert werden, wird dem LB-Medium oder dem LB-Agar das jeweilige Antibiotikum in einer geeigneten Konzentration zugesetzt.

3.6 Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*- Zellen

(Sambrook et al., 1989)

a) chemische Transformation:

Zur Transformation wird das jeweilige Plasmid auf 100 µl chemisch kompetente Zellen gegeben (die bei –80°C gelagerten Zellen werden auf Eis aufgetaut) und dieser Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein Hitzschock für 90 Sekunden bei 42°C; im Anschluss werden die Zellen 5 min auf Eis gelagert. Währenddessen werden 500 µl LB-Medium auf 37°C vorgewärmt und zu dem Transformationsansatz pipettiert. Zur Ausprägung der Antibiotika- Resistenz werden die Zellen für 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend 100 µl des Ansatzes auf einer LB- Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

b) Elektroporation

Bei dieser Methode wird das Plasmid zu 40 µl auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen gegeben. Dieser Ansatz wird in eine eisgekühlte

Elektroporationsküvette überführt, dabei muss darauf geachtet werden, dass der gesamte Boden der Küvette benetzt ist. Anschließend wird die Küvette in den Elektroporator gestellt und der Elektropuls ausgelöst. Die Einstellungen am Elektroporator werden wie folgt gewählt: 25 μ F Kapazität, 2.5 kV und 200 Ohm Widerstand. Nach dem Elektropuls sollte am Elektroporator eine Zeitkonstante von 4-5 Millisekunden und eine Feldstärke von 12.5 kV/cm angezeigt werden.

Nach dem Elektropuls wird sofort 1 ml SOC-Medium zu dem Ansatz gegeben. Nach der Überführung der Zellen in ein Polypropylenröhrchen werden diese 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 100 μ l auf LB-Platten ausplattiert.

Die Selektionsplatten werden jeweils über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.7 Präparation von Plasmid-DNA

3.7.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

(Birnboim und Doly, 1979)

Für die Plasmidisolierung im analytischen Maßstab wird zunächst die zu untersuchende Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer Konzentration von 50- 100 μ g/ml) angeimpft. Diese Kultur wird bei 37°C über Nacht geschüttelt. Im Anschluss wird die Plasmidisolierung durchgeführt, dafür wird benötigt

| Lösung I: | Lösung II: | Lösung III: |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------|
| 50 mmol/l Glucose | 0.2 mmol/l NaOH | 5 mol/l Kaliumacetat (pH 5.2) |
| 10 mmol/l EDTA (pH 8) | 1 % SDS | |
| 25 mmol/l Tris/HCl (pH 8) | | |

Zunächst werden 1.5 ml der Flüssigkultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm für 5 s zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 μ l der Lösung I resuspendiert. Im nächsten Schritt werden der Zellsuspension 200 μ l der Lösung II zugesetzt; diese Lösung dient der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wird

dem Lysat zur Neutralisation 150 µl der Lösung III zugegeben und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Danach wird der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 0.8 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird dann mit 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 15 min). Nach der Entfernung des Überstandes und Trocknung des Pellets wurde dieses in 20 µl A. dest. resuspendiert.

3.7.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab

(Genomed Jetstar Midi Präparation, nach Angaben des Herstellers)

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab werden zunächst 50 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum in einer Konzentration von 50- 100 µg/ml) mit den zu untersuchenden Zellen beimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für die DNA-Isolierung werden folgende Lösungen eingesetzt:

Lösung E1:

| | | |
|-----|--------|-------|
| 10 | mmol/l | EDTA |
| 100 | µg/ml | RNase |

Lösung E2:

| | | |
|-----|--------|------|
| 200 | mmol/l | NaOH |
| 1 | % | SDS |

Lösung E3:

| | | |
|-----|-------|---------------------|
| 3.2 | mol/l | Kaliumacetat (pH 5) |
|-----|-------|---------------------|

Lösung E4:

| | | |
|------|--------|----------------------|
| 600 | mmol/l | NaCl |
| 100 | mmo/l | Natriumacetat (pH 5) |
| 0.15 | % | Triton X100 |

Lösung E5

| | | |
|-----|--------|----------------------|
| 800 | mmol/l | NaCl |
| 100 | mmol/l | Natriumacetat (pH 5) |

Lösung E6:

| | | |
|------|--------|-------------------|
| 1.25 | mol/l | NaCl |
| 100 | mmol/l | Tris/HCl (pH 8.5) |

Zunächst werden die 50 ml Flüssigkultur in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert. Die Zentrifugationszeit beträgt 10 min. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 4 ml Puffer E1 resuspendiert. Der Zellsuspension wird dann 4 ml Puffer E2 zugegeben und für 5 min inkubiert. Dieser

Schritt dient der Zelllyse. Durch Zugabe von Puffer E3 wird der Ansatz neutralisiert und die Proteine gefällt. Im Anschluss wird 10 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Währenddessen wird die zur Aufreinigung der DNA benötigte Anionenaustauschersäule mit 10 ml der Lösung E4 äquilibriert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand auf die Säule geladen. Nachdem die Lösung vollständig über die Säule gelaufen ist, wird die Säule 2 x mit Puffer E5 gewaschen. Im Anschluss wird die Plasmid- DNA mit 5 ml Puffer E6 eluiert. Durch Zugabe von 0.7 Volumenanteilen Isopropanol und anschließender 30 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C wird die DNA gefällt.

Die DNA wird dann mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 80 µl A. dest. resuspendiert.

3.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgt nach Angaben des Herstellers

3.9 Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook et al, 1989)

Für die Agarose- Gelelektrophorese wird zunächst Agarose in TBE-Puffer gelöst; die Konzentration der Agarose beträgt in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0.8-2%.

10 x TBE

| | | |
|-----|--------|---------------|
| 900 | mmol/l | Tris (pH 7.9) |
| 900 | mmol/l | Borsäure |
| 20 | mmol/l | EDTA |

Die Agarose wird aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt und mit 10 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die aufzutrennende DNA wird mit 0.1 Volumenanteil eines 10 x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel

aufgetragen. Neben der zu untersuchenden Probe wird, abhängig von der Fragmentgröße, ein Standardmarker aufgetragen.

10 x Auftragspuffer

| | | |
|------|--------|----------------------|
| 40 | mmol/l | Tris/Acetat (pH 7.7) |
| 10 | mmol/l | EDTA |
| 0.01 | % | Bromphenolblau |
| 0.01 | % | Xylenblau |
| 2 | % | Ficoll |

Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet, die angelegte Spannung betrug 60-100 V. Nach Abschluss des Gellaufs konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente aufgrund des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert und dokumentiert werden.

3.10 Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung wurde das GFXTMDNA and Gel Band Purification Kit von Amersham verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.11 Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

(Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988)

Zur DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion werden von der Matrizen-DNA zwei gegenläufige Oligonukleotide (Primer) abgeleitet, welche den zu amplifizierenden Bereich umfassen.

Der Reaktionsansatz für eine PCR setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

| | | |
|---|----|-------------------------------|
| 5 | μl | 10 x PCR-Puffer |
| 1 | μl | Oligonukleotid 1 (25 pmol/μl) |

| | | |
|---------|----|-------------------------------|
| 1 | µl | Oligonukleotid 2 (25 pmol/µl) |
| 5 | µl | dNTP-Mix (2 mmol/l) |
| 10- 100 | ng | Matritzen-DNA |
| 1 | µl | Polymerase (1 U/µl) |
| ad. 50 | µl | A. dest |

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| | |
|-----------|------------------|
| Schritt 1 | 5 min bei 95°C |
| Schritt 2 | 1 min bei 95°C |
| Schritt 3 | 1 min bei X°C |
| Schritt 4 | X min bei 72°C |
| Schritt 5 | 10 min bei 72°C |
| Schritt 6 | Abkühlen auf 4°C |

Die Schritte 2-4 werden zyklische wiederholt (32-34 Zyklen). Schritt 1 diene dem erstmaligen Aufschmelzen der DNA; bei allen folgenden Zyklen wurde ein kürzerer Zeitraum für das Aufschmelzen der DNA gewählt (Schritt 2). Schritt 3 dient der Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer. Die in Schritt 4 gewählte Polymerisationszeit ist abhängig von der Polymerisationsgeschwindigkeit der Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden Fragments. Um nicht vollständig synthetisierte Stränge aufzufüllen wird in Schritt 5 nochmals für 10 min bei 72°C polymerisiert. Mit Schritt 6 wird die PCR-Reaktion beendet.

3.12 RT- PCR

Zum Nachweis einer spezifischen mRNA kann die Methode der RT-PCR zum Einsatz kommen, bei der die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase zunächst in eine cDNA umgeschrieben wird und die cDNA anschließend in einer PCR-Reaktion amplifiziert wird. Bei der RT-PCR unter Verwendung des QuiagenRT-One-Step-Kit setzt sich der Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten zusammen:

| | | |
|------|----|---------------------|
| 3.15 | µl | RNase freies Wasser |
| 4 | µl | 5 x RT-PCR Puffer |
| 0.8 | µl | dNTP-Mix |

| | | |
|--------|----|------------------------------|
| 4 | µl | Q-Solution |
| 3 | µl | Oligonukleotid 1, 10 pmol/µl |
| 3 | µl | Oligonukleotid 2, 10 pmol/µl |
| 0.8 | µl | Enzym-Mix |
| 0.25 | µl | RNase-Inhibitor |
| 1 | µl | Template-RNA |
| ad. 20 | µl | A. dest |

Die RT- PCR Reaktion wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| | |
|-----------|-----------------|
| Schritt 1 | 30 min bei 50°C |
| Schritt 2 | 15 min bei 95°C |
| Schritt 3 | 30 s bei 94°C |
| Schritt 4 | 30 s bei x °C |
| Schritt 5 | 1 min bei 72°C |
| Schritt 6 | 10 min bei 72°C |

Während des Schritt 1 erfolgt bei der RT-PCR die reverse Transkription und somit die cDNA- Synthese. Die folgende Schritte entsprechen der einer Standard-PCR-Reaktion. Die Schritte 3-5 werden zyklisch 35 x wiederholt.

3.13 Modifikation von DNA-Fragmenten

3.13.1 Kinasierung von 5'-Hydroxyenden nicht phosphorylierter DNA

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide besitzen ein unphosphoryliertes 5'-Ende. Soll ein solches Oligonukleotid für eine Ligation eingesetzt werden, muss demzufolge eine Phosphatgruppe an das 5'-Ende angehängt werden. Um dies zu erreichen wird die T4-Polynukleotidkinase eingesetzt. Als Phosphatdonor wird ATP verwendet. Das Gesamtvolumen beträgt 20 µl. Es werden 2 µl des 10 x Reaktionspuffer (Boehringer, Mannheim) und 1 µl PNK (10U/µl) eingesetzt, die Konzentration von ATP beträgt 2-5 mmol/l. Der Ansatz wird in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei 37°C für 30 min inkubiert.

3.13.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-Enden

Um nach dem Aufschneiden eines Vektors seine Religation zu unterbinden, besteht die Möglichkeit an seinem 5'-Ende die Phosphatgruppe abzuspalten. Für diese Reaktion wird eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm eingesetzt (calf intestine alkaline phosphatase: CIP). Zu dem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 µl) werden 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl CIP zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 1 µl CIP wird für 30 min bei 56°C inkubiert.

3.13.3 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

(Sambrook et al., 1989)

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Ende wird eine Polymerisationsreaktion mit dem Klenow-Fragment (großes Fragment der DNA- Polymerase I aus *E. coli*) durchgeführt. Hierfür wird pro µg DNA (mit 5'- Überhang) 1 µl eines 2 mmol/l dNTP-Mix, 1 Unit Klenow-Enzym und 1 x Puffer B (Boehringer) zugesetzt (Reaktionsansatz 20 µl). Die Polymerisation erfolgt bei 37°C für 30 min. Anschließend wird die DNA gelelektrophoretisch aufgereinigt.

3.14 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

a) Ligation von PCR-Produkten in den TOPO- Vektor

Der TOPO-Vektor liefert die Möglichkeit, PCR-Produkte direkt nach der PCR schnell und mit hoher Effizienz in einen Vektor zu klonieren. Wird das PCR-Produkt mit Hilfe einer *Taq*- Polymerase synthetisiert, wird der TOPO-TA-Vektor eingesetzt. Dieser Vektor enthält einen Doppelstrangbruch mit Thyminüberhang (erzeugt durch die Topoisomerase I; dieses Enzym wird kovalent an den Überhang gebunden und verhindert so die Religation). Da die *Taq*-Polymerase immer einen Adenin-Überhang erzeugt kann so das PCR-Produkt in den Vektor eingebracht werden.

Für die Ligation werden 1-4 µl PCR-Produkt mit 0.5 µl Vektor gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in TOP 10- Zellen transformiert.

Nach Abschluss der Transformation werden 100 µl der Zellen auf LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten ausplattiert.

Wird das PCR-Produkt mit Hilfe einer Proof Reading Polymerase erzeugt, wird der TOPO Zero Blunt Vektor für die Reaktion eingesetzt. Die Ligation und Transformation erfolgt wie oben beschrieben. Zur Selektion positiver Klone werden 100 µl der Zellen auf LB-Kanamycin-IPTG-X-Gal-Platten ausplattiert.

b) Ligation von DNA-Fragmenten in andere Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Für die Reaktion werden 50- 100 ng des Vektors eingesetzt. Das DNA-Fragment (Insert) wird im 2-10 x molaren Überschuss verwendet. Der Reaktion wird 1 µl der T4-DNA-Ligase zugesetzt, sowie 2 µl 10 x Ligationspuffer. Das Gesamtvolumen beträgt 20 µl. Die Reaktion wird entweder 4 h bei Raumtemperatur, 12 h bei 16°C oder 48 h bei 4°C inkubiert.

3.15 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA). Zur Messung der Extinktion werden Quarzküvetten verwendet. Von der zu untersuchenden Lösung wird 1 µl mit A. dest. auf 1 ml verdünnt und die Extinktion im Photometer bei 260 nm gemessen. Zuvor wird durch Messung der Extinktion von A. dest. bei 260 nm der Nullpunkt der Messung festgelegt. Aus der Absorption (OD) lässt sich aufgrund folgender Beziehung die Konzentration doppelsträngiger DNA in µg/ml bei einer Küvetteneschichtdicke von 1 cm berechnen:

$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Neben der Extinktion der Lösung bei 260 nm wird auch die Extinktion bei 280 nm gemessen. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen; ermittelt man den Quotienten E_{260}/E_{280} kann man eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der DNA durch Proteine machen. Der Quotient sollte einen Betrag zwischen 1.6 und 1.8 haben.

3.16 DNA-Fällung mit Ethanol

(Ausubel et al., 1993; Crouse and Amorese, 1987)

Um eine DNA-haltige Lösung anzukonzentrieren oder um die DNA von Verunreinigungen durch Salze zu befreien, besteht die Möglichkeit, die DNA zu fällen und das dabei entstehende Pellet im Anschluss zu resuspendieren. Hierbei wird die DNA-Lösung mit 0.1 Volumenanteilen Natriumacetat (3 mol/l pH 4.8) und 2.5 Volumenanteilen 96% Ethanol ($T = -18^{\circ}\text{C}$) versetzt und für 15 min bei -18°C inkubiert. Im Anschluss wird der Ansatz bei 4°C für mind. 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer geeigneten Menge A. dest resuspendiert.

3.17 Mikroinjektion

(Rubin und Spradling, 1982)

3.17.1 Aufreinigung von DNA über Elutip- Säulen

(Elutip-d-Säulen, Schleicher und Schüll, nach Angaben des Herstellers)

Für die Mikroinjektion von DNA in *Drosophila*-Embryonen benötigt man hochreine DNA. Zur Aufreinigung werden Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll) verwendet. 2 ml Hochsalzpuffer werden mit einer 2 ml Spritze über die Säule gegeben (Tropfgeschwindigkeit: ca. 1 Tropfen/10 s).

Im Anschluss werden zunächst 5 ml Niedrigsalzpuffer und dann mind. 30 μg DNA vermischt mit 5 ml Niedrigsalzpuffer über die Säule gegeben.

Nach zweimaliger Waschung mit 5 ml Niedrigsalzpuffer erfolgt die Elution der DNA, mit 0.4 ml Hochsalzpuffer. Das Eluat wird mit 0.8 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und durch 30minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm gefällt. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Resuspension des Pellets erfolgt in 10-20 μl A. dest.

Hochsalzpuffer

| | | |
|----|--------|-------------------|
| 1 | mol/l | NaCl |
| 20 | mmol/l | Tris/HCl (pH 7.5) |
| 1 | mmol/l | EDTA |

Niedrigsalzpuffer

| | | |
|-----|--------|-------------------|
| 200 | mmol/l | NaCl |
| 20 | mmol/l | Tris/HCl (pH 7.5) |
| 1 | mmol/l | EDTA |

3.17.2 Vorbereitung der Embryonen für die Injektion

Für die Mikroinjektion werden ca. 200 drei Tage alte *white*-Fliegen in eine mit Drahtnetz verschlossene Kunststoffdose gegeben. Zur Eiablage werden auf diese Dose mit Hefe bestrichene Apfelsaft- bzw. Traubensaftagarschälchen gestülpt. Am Tag der Injektion werden die Agarschälchen zunächst stündlich gewechselt (dient der Synchronisation der Eiablage). Die für die Injektion bestimmten Ablagen werden in 15minütigem Abstand abgesammelt. Die Embryonen werden mit 0.7% NaCl gewaschen und das Chorion mit einer Natriumhypochloridlösung (Dan-Klorix 1:1 mit Wasser gemischt) entfernt. Im nächsten Schritt werden die Embryonen auf einem Agarblock aufgereiht und mit dem anterioren Ende zum Rand hin ausgerichtet. Dann wird ein mit Klebstoff (von 10 cm Tesa-Packband in 10 ml Heptan abgelöster Klebstoff) beschichtetes Deckglas mit leichtem Druck auf die Embryonen gelegt. Auf diese Art werden die Embryonen mit ihrem posterioren Ende zum Rand hin auf das Deckglas aufgeklebt. Anschließend werden die Embryonen für 10-15 min im Exikator getrocknet und dann mit Öl überschichtet.

3.17.3 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion

Von der zu injizierenden DNA wurden 10 µg eingesetzt, hinzu kommen 2.5 µg des Helferplasmids p π 25.7wc. Zusätzlich werden 2.5 µl eines 10 x Injektionspuffers benötigt.

10 x Injektionspuffer

| | | |
|-----|--------|---|
| 0.1 | mmol/l | Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7.4) |
| 5 | mmol/l | KCl |

Der Ansatz wird mit A. dest. auf 25 µl aufgefüllt und für mind. 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert (dieser Schritt dient der Sedimentation von Partikeln, welche die Injektionsnadel verstopfen könnten).

3.17.4 DNA-Injektion

Zur Injektion werden Glaskapillaren in einem Kapillarenziehgerät ausgezogen. Etwa 1 µl der Injektions-DNA werden mit einer Befüllungskapillare in die Injektionsnadel eingefüllt. Nach der Einspannung der Nadel in die Injektionsapparatur wird die zu geschmolzene Spitze der Injektionsnadel unter mikroskopischer Kontrolle am Rande des Deckglases aufgebrochen und in das die Embryonen bedeckende Öl eingetaucht. Danach wird die Nadel vorsichtig in das posteriore Ende der Embryonen eingeführt. Der Injektionsdruck wird so eingestellt, dass die DNA-Lösung nur nach Einführung in den Embryo, nicht jedoch in die Ölphase, ausströmt.

3.17.5 Nachbehandlung der injizierten Embryonen

Nach der Injektion werden die Deckgläser mit den injizierten Embryonen in eine feuchte Apfelsaftagarschale gelegt und bei 25°C inkubiert. Die schlüpfenden Larven werden mit einer Präpariernadel vorsichtig abgesammelt und in kleine, mit Hefe bestrichene Zuchtflaschen überführt. Bei 25°C werden diese Flasche so lange inkubiert, bis die adulten Fliegen schlüpfen. Diese werden in Einzelpaarkreuzungen mit *white*-Fliegen gekreuzt. Da für die Injektion Embryonen von *white*- Fliegen (weiße Augen) verwendet werden und sich auf den für die Injektion verwendeten Vektoren ein *white+*-Marker (bewirkt die Entwicklung von roten Augen) befindet, werden im Anschluss adulte Fliegen mit einer rötlichen Augenfarbe weiter verwendet.

3.18 Isolation von mRNA aus *Drosophila*-Embryonen

Zunächst wird mit Hilfe von Trizol die Gesamt-RNA aus den *Drosophila*-Embryonen isoliert. Hierzu werden die Embryonen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol homogenisiert. Das Volumen der Embryonen sollte etwa 10% des Trizol-Volumens entsprechen. Anschließend wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 0.2 ml Chloroform für 15 s kräftig geschüttelt und nochmals 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Zentrifugation für 15 min bei 10000 rpm und einer Temperatur von 4°C. Die dabei entstehende wässrige obere Phase wird in ein neues Cup überführt und mit 0.5 ml Isopropanol

zur RNA-Fällung versetzt. Danach wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird das dabei entstehende RNA- Pellet mit 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 7000 rpm und 4°C). Nach Trocknung des RNA- Pellets wird dieses in 50 µl Wasser gelöst.

Aus der so gewonnenen Gesamt-RNA kann unter Verwendung des Oligotex Kits von Quiagen nach dem Oligotex mRNA Batch Protokoll (Oligotex Handbook, Second edition) mRNA isoliert werden. Bei allen Schritten ist darauf zu achten RNase frei zu arbeiten.

3.19 Primer-Extension

Mit Hilfe der Primer-Extension kann der Transkriptionsstart eines Gens ermittelt werden, indem man mit Hilfe einer reversen Transkriptase und eines infrarot markierten Primers eine cDNA herstellt und deren Länge durch den Vergleich mit einer unter Verwendung des gleichen Primers durchgeführten Sequenzierreaktion ermittelt.

Für die reverse Transkription werden 0.5 µg mRNA eingesetzt und mit 2 pmol infrarot markiertem Primer und 1 µl 10 mmol/l dNTP- Mix versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt und kurz anzentrifugiert. Danach erfolgt die Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Buffer, 2 µl 0.1 mol/l DTT und 1µl RNase out. Der Ansatz wird gut durchmischt und vor Zugabe von 1 µl SuperscriptII Reverse Transkriptase für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach der Zugabe der reversen Transkriptase erfolgt die Reaktion bei 42°C für 50 min. Das anschließende Erhitzen auf 70°C für 15 min stoppt die Reaktion.

Die so hergestellte cDNA wird durch Zugabe von 175 µl TES-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5; 1 mmol/l EDTA, pH 7.5 und 1 g/l SDS) und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Der Ansatz wird kräftig geschüttelt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Cup transferiert und die cDNA durch Zugabe von 1 µl Glykogen (10 µg/µl) und 600 µl für mind. 1 h bei -80°C gefällt. Anschließend wird die cDNA durch Zentrifugation (15 min bei 13000 rpm) präzipitiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen

(Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm) Nach der Trocknung des Pellets wird die cDNA in 6 µl Wasser aufgenommen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der infrarot markierten Primer sollten alle Schritte unter Lichtausschluss erfolgen.

3.20 Binding Site Screen

Mit Hilfe eines Binding Site Screens ist es möglich, Proteine zu identifizieren, die in der Lage sind an DNA zu binden. Hierbei wird mit Hilfe von IPTG die Expression von Proteinen einer zuvor ausplattierten λ -cDNA-Expressionsbank induziert. Diese Proteine werden anschließend auf Nitrocellulosefiltern fixiert. Durch die Inkubation eines DIG- oder radioaktiv markierten DNA-Fragments auf den Filtern ist es möglich, cDNAs zu identifizieren, die für Proteine codieren, welche in der Lage sind an das für den Screen eingesetzte DNA-Fragment zu binden.

3.20.1 Titerbestimmung der λ -cDNA- Expressionsbank

Um die für den Screen einzusetzende Menge der λ -cDNA-Bank zu ermitteln, wird zunächst der Titer der Phagenbank bestimmt. Hierzu wird die Phagenbank in SM-Puffer 1:1000, 1:10000 und 1:100000 verdünnt und je 10 µl der Verdünnung mit 60 µl Bakteriensuspension (LE 392-Zellen; diese werden mit 0.2% Maltose und 10 mmol/l MgSO_4 im Medium über Nacht bei 37°C kultiviert, bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert und in 15 ml 10 mmol/l MgSO_4 T = 4°C resuspendiert) gemischt. Anschließend wird der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 4 ml Topagarose (T = 55°C) zugegeben und mit den Zellen gemischt. Die Agarose wird zügig auf NZY- Platten verteilt. Die Platten werden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Medium für NZY-Platten (1L)

| | | |
|----|---|------------------|
| 5 | g | NaCl |
| 2 | g | MgSO_4 |
| 5 | g | Hefeextrakt |
| 10 | g | Caseinhydrolysat |
| 15 | g | Agar |

Medium für NZY-Topagarose (200 ml)

| | | |
|-----|---|------------------|
| 1 | g | NaCl |
| 0.4 | g | MgSO_4 |
| 1 | g | Hefeextrakt |
| 2 | g | Caseinhydrolysat |
| 1.4 | g | Agarose |

| | | | |
|-------|---|------|---|
| 10 ml | Maltose; steril (Zugabe nach dem Autoklavieren) | 2 ml | Maltose; steril (Zugabe nach dem Autoklavieren) |
|-------|---|------|---|

SM-Puffer (500 ml)

5.8 g NaCl

2 g MgSO₄

50 ml 1 mol/l Tris/HCl (pH 7.5)

3.20.2 Screenen der λ -cDNA-Expressionsbank

Für den Binding Site Screen werden 20000- 30000 Phagen der λ -cDNA-Expressionsbank auf großen NZY-Platten ausplattiert. Hierzu wird zunächst eine geeignete Menge der Bank mit 600 μ l der Bakteriensuspension gemischt (LE 392; Kultivierung s. Punkt 3.20.1) und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml Topagarose werden die Zellen zügig auf große, vorgewärmte NZY- Platten ausplattiert. Anschließend werden die Platte so lange bei 37°C inkubiert bis die Plaques gerade sichtbar werden (3-5 h). In der Zwischenzeit werden die Nitrocellulosefilter mit 10 mmol/l IPTG getränkt (5 min) und dann getrocknet. Nach dem Sichtbarwerden der Plaques werden die Filter auf die Platten aufgelegt und durch Einstiche markiert. Es folgt die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht.

Am nächsten Morgen werden die Platten zunächst für ca. 30 min auf 4°C gestellt, anschließend werden die Filter abgezogen und getrocknet. Um möglichst eine korrekte Faltung der auf der Membran gebundenen Proteine zu erreichen, werden diese zunächst einer Denaturierung mit anschließender Renaturierung unterzogen. Hierzu werden die Filter 2 x 10 min mit 6 mol/l Guanidiniumhydrochlorid in 1 x Bindepuffer gewaschen und anschließend je 1 x 5 min in einer absteigenden Verdünnungsreihe von Guanidiniumhydrochlorid in 1 x Bindepuffer (3 mol/l, 1.5 mol/l, 0.75 mol/l, 0.375 mol/l und 0.1875 mol/l). Abschließend werden die Filter 2 x 5 min in 1 x Bindepuffer gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen werden die Filter dann 1 x 30 min in 5% Blockinglösung (Trockenmilchpulver in 1 x Bindepuffer) und 1 x 5 min in 0.25% Blockinglösung inkubiert.

Die Hybridisierung der Filter mit der DIG-markierten Sonde erfolgt in 100 ml 1 x Bindepuffer für 2 h. Danach werden die Filter 3 x 5 min mit 1 x Bindepuffer

gewaschen und im Anschluss erfolgte die Dedektion der DIG- markierten DNA-Probe (Markierung der Sonde und Nachweis der DIG-Markierung s. Punkt 3.4.1 und 3.4.2).

| | | | | | |
|---------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|------------|------------------|
| 10 x Bindepuffer (500 ml) | | | 1 x Bindepuffer (1l) | | |
| 100 | ml | 1 mol/l HEPES (pH 7.9) | 100 | ml | 10 x Bindepuffer |
| 7.5 | ml | 2 mol/l MgCl ₂ | 1 | mmol/l | DTE |
| 100 | ml | 2 mol/l KCl | ad. | 1 l A.dest | |
| ad. | 500 ml A. dest | | | | |

3.21 Yeast One Hybrid Screen

Der Yeast One Hybrid Screen dient, ebenso wie der Binding Site Screen, der Identifikation von Proteinen, die in der Lage sind an DNA zu binden. Bei diesem Screen wird eine cDNA-Bibliothek eingesetzt, bei der die cDNAs mit einer Sequenz verknüpft wurden, die für die Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 codiert. Das zu testende DNA-Fragment wird in Vektoren kloniert, die als Reportergen das His3- oder das lacZ-Gen beinhalten und in das Hefe-Genom eingebracht. Nach der Transformation der Hefe-Reporterstämme mit der cDNA-Bank können cDNA-Klone die Proteine codieren, welche an die Test-DNA-Sequenz binden, aufgrund der Aktivierung des Histidin- oder lacZ-Reportergens in den entsprechenden Hefe-Transformanten isoliert werden.

3. 21.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wird nach dem Protokoll der Lithium-Acetat vermittelten Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen vorgegangen (CLONTECH Yeast Protocol Handbook; 2001).

Die mit dem Histidinreportergenvektor transformierten Hefen werden auf Selektionsplatten ohne Histidin ausplattiert, die mit dem lacZ-Reportergenvektor transformierten Hefen auf Selektionsplatten ohne Uracil.

Die Herstellung des Hefemediums bzw. der Hefeplatten YEPD und der Selektionsplatten SD (–His) und SD (–Ura) erfolgt nach den Angaben des Yeast Protocol Handbook (2001) von CLONTECH.

3.21.2 Titration mit 3-Amino-1, 2,4 Triazol (3- AT)

Bei 3-AT handelt es sich um einen Inhibitor des His3-Genprodukts. Dieser wird zur Unterdrückung der Hintergrundexpression des Histidin-Reportergens verwendet. Zur Ermittlung der für die Durchführung des Screens optimalen 3-AT-Konzentration muss zunächst ermittelt werden, bei welcher 3-AT-Konzentration das Wachstum des mit dem Histidinreportervektor transformierten Hefestamms vollständig unterbunden wird. Dazu werden –His-Selektionsplatten mit 15, 30, 45 und 60 mmol/l 3-AT hergestellt, der Hefestamm ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert

3.21.3 Nachweis der β -Galactosidase-Expression

Zum Nachweis der β -Galactosidase- Produktion des lacZ-Reporterstamms wird auf eine Platte mit frischen Hefekolonien des lacZ-Reporterstammes ein Nitrozellulosefilter aufgelegt. Nach Abzug der Hefekolonien von der Platte wird der Filter in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann auf einen mit Färbepuffer (Yeast Protocol Handbook von CLONTECH, 2001) getränkten Whatmanfilter aufgelegt. Anschließend wird der Filter bei 30°C inkubiert, bis es zu einer Blaufärbung der Hefekolonien kommt.

3. 21.4 Screenen der MATCHMAKER cDNA-Bibliothek

Der Screen der cDNA-Bibliothek erfolgt nach dem Protokoll im MATCHMAKER One-Hybrid System User Manual (CLONTECH). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund hoher β -Galactosidase-Hintergrund-Expression kein dualer Reporterstamm verwendet, aus diesem Grund erfolgte die Ausplattierung des Transformationsansatzes auf SD (-His, -Leu)-Platten + 45 bzw. + 60 mmol/l 3-AT. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 30°C für 4-6 Tage. Große Hefekolonien wurden anschließend zur Lagerung auf neue Selektionsplatten überimpft

3.21.5 Isolierung der Hefepasmide und Transformation der Plasmide in *E. coli*

Zur Isolation der Hefepasmide werden 3 ml SD (-His,- Leu)-Flüssigmedium mit einer entsprechenden Hefekolonie angeimpft und auf dem Schüttler (200- 250 rpm) bei

30°C über Nacht inkubiert. Von dieser 3 ml werden anschließend 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 13000 rpm herunter zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid -DNA erfolgt nach den Angaben des Yeast Protocol Handbook von CLONTECH (2001).

Die isolierten Hefe-Plasmide werden durch Elektroporation (s. Punkt 3.7b) in DH5 α -Zellen transformiert und auf mit Ampicillin versetzten LB- Platten ausgestrichen.

4. Ergebnisse

4.1 Eine ca. 1 kb umfassende Deletion der Promotorregion von *rols6* führt zu einem Ausfall der *rols6* Transkription, die Transkription von *rols7* ist jedoch nicht betroffen

Da das *rols*-Gen für zwei am 5'-Ende variierende Transkripte codiert, besteht die Möglichkeit, dass die Transkription durch zwei voneinander unabhängige Promotoren reguliert wird. Ist dies der Fall, sollte die Deletion eines Promotors auf die Transkriptionsaktivität des zweiten Promotors keinen Einfluss haben. Aus diesem Grund wurde eine Fliegenlinie (EP(3)3330*5a) mit einer Deletion des putativen *rols6* Promotors (Dissertation Pütz, 2004) auf die Transkription von *rols6* und *rols7* hin überprüft. *In situ*-Hybridisierungen mit einer 3'-Sonde aus dem gemeinsamen 3'-Bereich der mRNA zeigen, dass in Wildtypembryonen das *rols6*-Transkript in den Anlagen der Malphigi-Gefäße sowie im AMG und PMG (Abb. 4.1A+B) und das *rols7*-Transkript in der viszeralen und somatischen Muskulatur nachgewiesen werden kann (Abb.4.1A+B). In Embryonen der Linie EP(3)3330*5a kann nur das *rols7*-Transkript in der somatischen und viszeralen Muskulatur dedektiert werden (Abb. 4.1C+D).

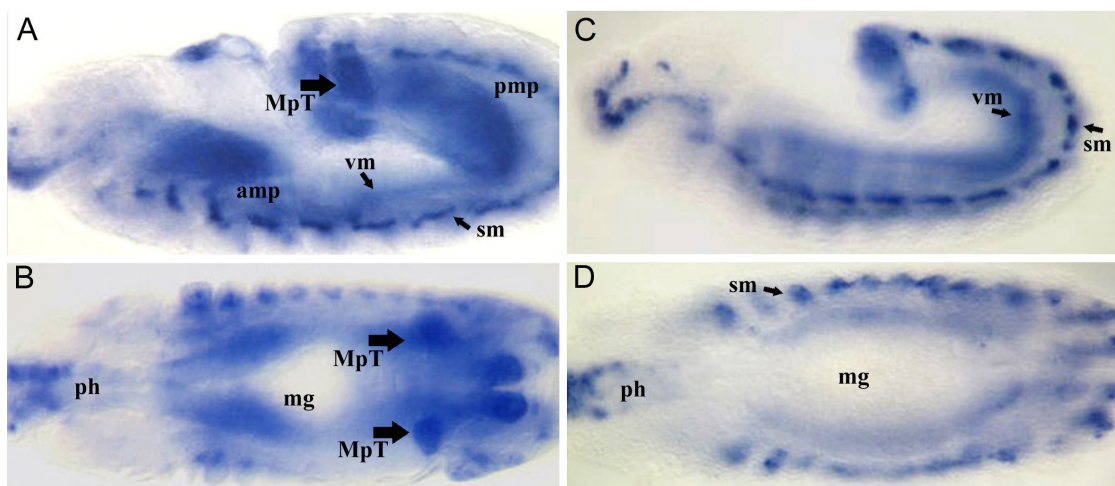


Abb.: 4.1 Nachweis der *rols*-Transkripte mit einer *rols7* und *rols6* dedektierenden 3' RNA-Sonde: Analysiert wurde die Expression in Wildtypembryonen der Stadien 11/12 (A) und 13 (B) und an EP(3)3330*5a-Embryonen der Stadien 11/12 (C) und 13 (D). In Wildtyp-Embryonen kann *rols7* im viszeralen und somatischen Mesoderm, sowie *rols6* in den Anlagen der Malphigies und des Mitteldarms (AMG und PMG) nachgewiesen werden. In mutanten Embryonen der Linie EP(3)3330*5a wird nur das *rols7*-Transkript im viszeralen und somatischen Mesoderm dedektiert.

4.2 Die Analyse der 5' vom ersten *rols7*-Exon gelegenen genomischen Region auf enthaltene cis-regulatorische Sequenzen, welche die räumliche und zeitliche korrekte Transkription des *rols7*-Transkripts koordinieren

Um die räumlich und zeitliche korrekte Transkription eines Gens zu initiieren ist das Zusammenspiel des Core-Promotors, an den die generellen Transkriptionsfaktoren binden, mit den cis-regulatorischen Elementen, an welche die regulativen Transkriptionsfaktoren binden, essentiell. Cis-regulatorische Elemente können sowohl 5' als auch 3' vom Transkriptionsstart lokalisiert sein, ebenso können sie sich in Introns, in untranslatierten Bereichen und in codierenden Regionen des Gens befinden, dessen Expression sie steuern. Um cis-regulatorische Elemente zu identifizieren die sich in der 5' von *rols7* gelegenen genomischen Region befinden wurde eine Serie von Reportergenkonstrukten erstellt und zur Analyse der Reportergenexpression in das Genom von *D. melanogaster* eingebracht. In Abb. 4.2 werden die erstellten Promotorkonstrukte im Verhältnis zu ihrer Lage im putativen *rols7*- Promotor dargestellt.

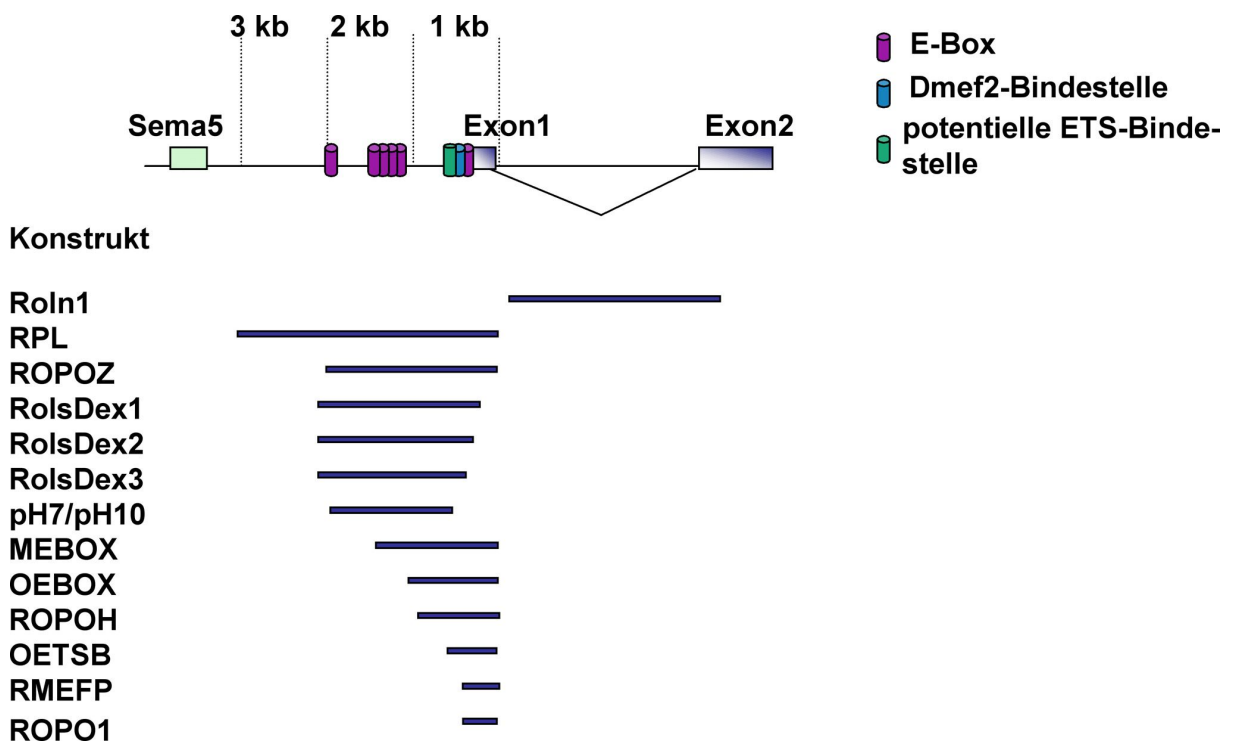


Abb.:4.2 Schematische Darstellung der *rols7*-Promotorregion mit den putativen E-Boxen, der Mef2- und der putativen ETS-Bindestelle. Die Darstellung der Bindestellen und des 1. Exons gehen hierbei von der Länge des 1. Exons der LDCDNAI aus (s. Anhang).

4.2.1 Ein ca. 3 kb umfassendes genomisches Fragment upstream des *rols*-Locus ist in der Lage eine räumlich und zeitlich spezifische Reporterexpression zu steuern.

Um 5' von *rols7* gelegenen cis-regulatorische Sequenzen zu identifizieren, wurde zunächst ein ca. 3 kb großes genomisches Fragment (RPL) analysiert. Dieses Fragment umfasste fast den gesamten 5' des 1. *rols7* Exon gelegenen Bereich bis zum nächsten 5' von *rols* gelegenen Gen (Semaphorin5C). Um sicher zu stellen, dass alle wichtigen Elemente des Core- Promotors enthalten sind und diese z.T. 3' des Transkriptionsstart lokalisiert sein können (z.B. das DPE oder das MED) wurden mind. 280 bp des mind. 298 bp umfassenden 1. Exons von *rols7* ebenfalls in das Konstrukt integriert. Da der Transkriptionsstart von *rols7* zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig festgestellt war konnte auch die Länge des 1. Exons nicht eindeutig bestimmt werden. Aufgrund erster Ergebnisse aus RT- PCR Versuchen mit unterschiedlich lokalisierten 5' Primern erschien es jedoch wahrscheinlich, dass die Länge des 1. Exons auf genomischem Niveau die Länge des 1. Exons der LDcDNAI (s. Anhang) um nicht mehr als 50-60 bp übersteigt (persönliche Mitteilung D. Buttgerit).

Der zu untersuchenden DNA-Abschnitt wurde mit Hilfe der Primer ROPRKU (5' Primer) und POPRIU (3' Primer) (Lokalisation aller verwendeten Primer s. Anhang) und dem genomischen Klon Phage „PY“ als Template in einer PCR Reaktion amplifiziert, in den pCRII TOPO-TA Vektor zwischenkloniert und anschließend über die Schnittstellen EcoRI und SpeI in den P-Element-Transformationsvektor pChabΔSal ligiert. Der P-Element-Transformationsvektor pChabΔSal enthält als Reporter gen das *lacZ*-Gen; dieses besitzt jedoch keinen eigenen Transkriptionsstart, sondern nur ein Translationsinitiationscodon. Soll das *lacZ*-Gen transkribiert werden, muss ein funktionaler Promotor mit Transkriptionsstart und cis- regulatorischen Sequenzen eingefügt werden. Durch die Analyse der räumlichen und zeitlichen Expression des Reporter genprodukts kann dann auf die regulativen Eigenschaften des eingefügten DNA- Fragments rückgeschlossen werden (Abb. 4.2.1 a)

Multiple Cloning Site
EcoRI, KpnI, SmaI, XmaI,
SacII, NotI, SpeI, BamHI,
XbaI, Sall, SmaI, XmaI

pChab Δ Sal

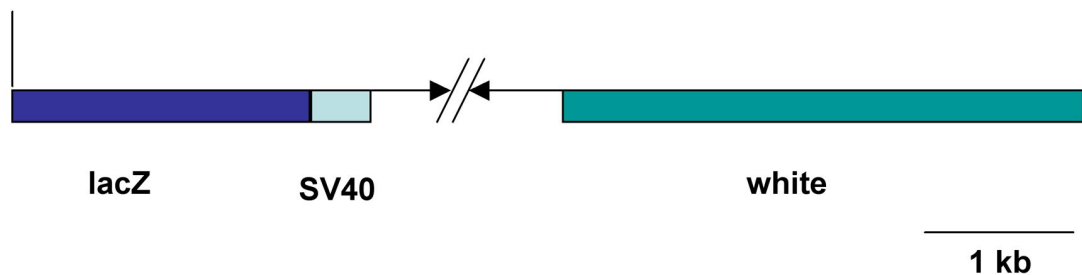


Abb. 4.2.1a : Schematische Darstellung des P-Element-Transformationsvektors pChab Δ Sal

Nach der Keimbahntransformation und der Etablierung transgener Linien erfolgte der Nachweis der Reportergenexpression in Embryonen mit einem in Kaninchen hergestellter polyklonaler α - β -Gal-Antikörper.

Embryonal kann eine Expression des Reportergens ab Stadium 10 (verlängerter Keimstreif) im somatischen Mesoderm und in der Pharynx- Muskulatur nachgewiesen werden (Abb. 4.1b A) Diese Expression persistiert bis zur Ausbildung der Muskulatur in Stadium 15/16, wobei zunächst die Founder- und Precursorzellen die Expression zeigen (Abb 4.1b B). Ab Stadium 14/15 lässt sich beobachten, dass fusionskompetente Myoblasten die Kontakt zu einem in der Entwicklung befindlichen Muskel aufgenommen haben, ebenfalls Reportergenaktivität aufweisen (Abb. 4.1b C). Weiterhin kann das Reportergenprodukt ab ca. Stadium 14 im Dorsalgefäß nachgewiesen werden (Abb. 4.1b D). In der viszerale Muskulatur und deren Vorläufern konnte keine β -Galaktosidase nachgewiesen werden (Abb. 4.2.1b).

Zur Kontrolle wurden Embryonen gefärbt welche den leeren pChab Δ Sal-Vektor im Genom integriert hatten. Bei diesen Embryonen konnte keine spezifische Färbung beobachtet werden.

Larval, pupal und adult kann (unter Verwendung von X-Gal) keine nennenswerte β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

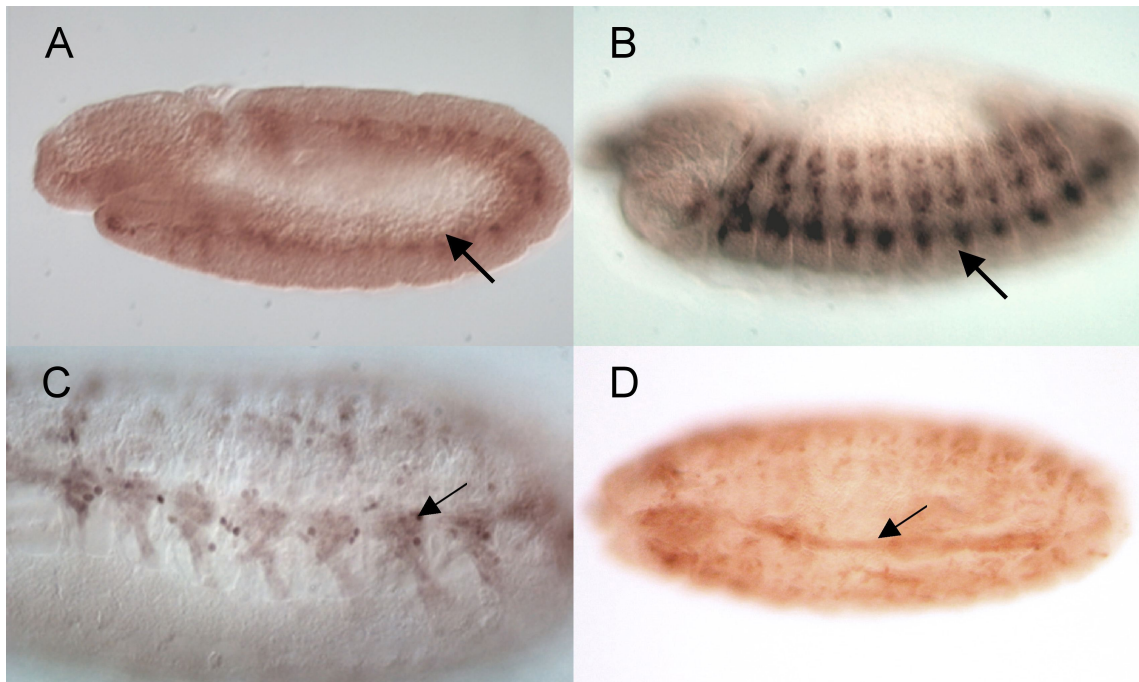
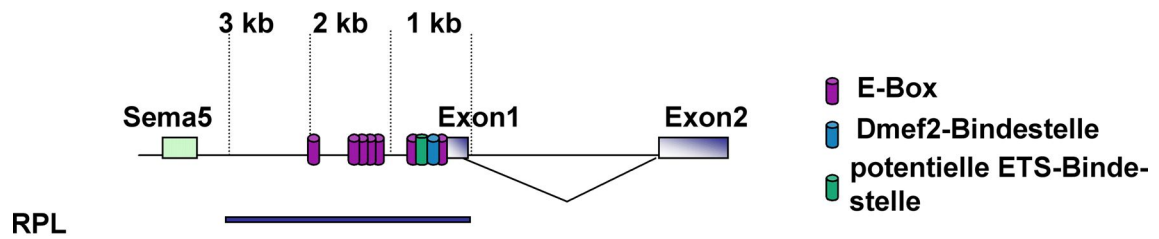


Abb. 4.2.1 b: Reporter-Expression des Konstruktes RPL. A: somatisches Mesoderm (Pfeil), Stadium 10/11; B: Muskel- Precursor (Pfeil), Stadium 13; C: Muskeln und fusionskompetente Myoblasten (Pfeil), Stadium 15; D: Dorsalgefäß (Pfeil), Stadium 16

4.2.2 Ein 1 kb Fragment upstream des *rols7*-Locus steuert eine schwache zeit- und gewebespezifische Expression des Reportergens

Um den für die spezifische Reporterexpression benötigten Bereich weiter einzuschränken, wurden 5' Deletionen der in Punkt 4.1.1 beschriebenen putativen Promotorregion von *rols7* vorgenommen, die jeweils ca. 1kb umfassten. So wurde ein 2 kb Konstrukt (ROPOZ) und ein 1 kb Konstrukt (ROPOE) erzeugt. Hierfür wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zunächst mit den Primern ROPRD und ROPRIUI (ROPOZ) bzw. ROPRDII und ROPRIUI (ROPOE) (s. Anhang) unter Nutzung des Promotor- Konstrukts RPL als Template in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Nach der Klonierung des PCR- Produkts in den pCRII TOPO TA Vektor wurden die Fragmente mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und SpeI aus pCRII TOPO ausgeschnitten und in den Vektor pChabΔSal kloniert. Der Nachweis der

Reporterogenaktivität in transgenen Embryonen erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen α - β -Gal-Antikörpers.

Sowohl bei Embryonen mit einer Integration des ROPOZ- als auch bei Embryonen mit einer Integration des ROPOE-Konstrukts kann eine Reporterexpression ab Stadium 10 im somatischen Mesoderm beobachtet werden. Die zu beobachtende Expression entspricht sowohl räumlich als auch zeitlich der in Punkt 4.2.1 beschriebenen Reporterexpression des Konstruktes RPL.; in Abb 4.2.2 ist exemplarisch die Reporterexpression der Konstrukte ROPOZ (A) und ROPOE (B) im Stadium 13 dargestellt. Allerdings ist die Expressionshöhe der durch das ROPOE-Konstrukt gesteuerten Reporterogenaktivität im Vergleich zum Expressionsniveau der Konstrukte RPL und ROPOZ deutlich reduziert. In diesem Fall kann die β -Galactosidase nur nachgewiesen werden, wenn die Antikörperreaktion mit Hilfe des TSA-Enhancer Kits verstärkt wird.

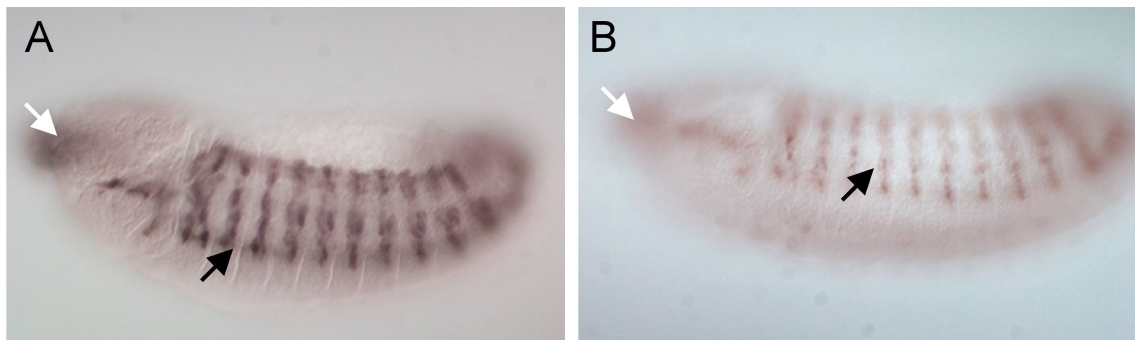
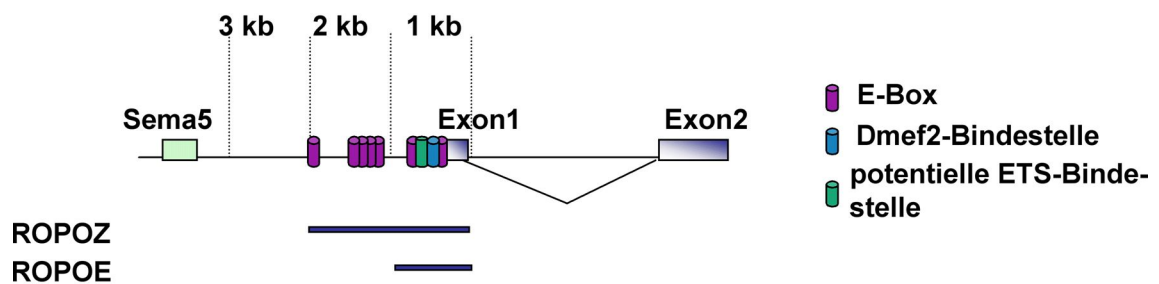


Abb.4.2.2: Reporterexpression der Konstrukte ROPOZ (A) und ROPOE (B) in den Muskel-Precursorzellen (schwarzer Pfeil) und der Pharynx-Muskulatur (weißer Pfeil) in Embryonen des Stadium 13

4.2.3 Der Vergleich zweier Konstrukte die einen Cluster von 4 E-Boxen bzw. E-Box ähnlichen Motiven enthalten bzw. deletieren zeigt keine Unterschiede im Niveau der Reportergenexpression

Die in Punkt 4.1.2 beschriebene Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das 2 kb-Fragment in der Lage ist eine stärkere Genexpression zu steuern als das 1 kb-Fragment. Aufgrund dessen erscheint es wahrscheinlich, dass zwischen 1 und 2 kb upstream des *rols*-Locus ein Enhancer-Element lokalisiert ist und für ein ausreichendes Expressionsniveau von *rols7* benötigt wird. In diesem Bereich ist ein Cluster von vier E-Boxen bzw. E-Box ähnlich Motiven (CANNTG) und eine einzelne E-Box lokalisiert (s. Abb 4.2 und Anhang). Bei E-Boxen handelt es sich um Bindestellen von bHLH-Transkriptionsfaktoren. Es ist bekannt dass Transkriptionsfaktoren wie Twist, die zu dieser Proteinfamilie gehören sowohl bei der Determination als auch der Differenzierung des somatischen Mesoderms eine Rolle spielen (Leptin, 1991). Dies lässt einen Test auf die Funktionalität des E-Box-Clusters upstream des *rols7*-Gens sinnvoll erscheinen. Zu diesem Zweck wurden ausgehend vom ROPOZ-Konstrukte (hohes Expressionsniveau) zwei 5' verkürzte Konstrukte erzeugt. Das Konstrukt MEBOX endet mit der letzten E-Box des Clusters und enthält somit vier E-Boxen; das Konstrukt OEBOX hingegen deletiert alle E-Boxen (Abb. 4.2.3 und Anhang) Um diese Konstrukte herzustellen, erfolgte wiederum eine Amplifikation der DNA-Fragmente mit Hilfe einer PCR-Reaktion. Als Primer dienten MEBOX und ROPRIUI (für das Konstrukt MEBOX) bzw. OEBOX und ROPRIUI (für das Konstrukt OEBOX); als Template wurde das Konstrukt RPL eingesetzt. Nach der Zwischenklonierung der PCR-Produkte in den pCRII TOPO TA Vektor wurde die Fragmente unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und SpeI aus pCRII TOPO ausgeschnitten und in den P-Element- Transformationvektor pChabΔSal ligiert.

Nach der Etablierung der transgenen Linien erfolgte der embryonale Nachweis der Reportergenaktivität mit Hilfe eines polyklonalen α - β -Gal- Antikörpers.

Beide Konstrukte sind in der Lage eine Reportergenexpression von Stadium 10 im somatischen Mesoderm zu steuern. Das räumliche und zeitliche Muster der Reportergenaktivität entspricht hierbei dem in Punkt 4.2.1 (s. Abb 4.2.1b) beschriebenen Muster. Sowohl bei MEBOX als auch bei OEBOX ist ein Antikörperrnachweis der β -Galaktosidase nur unter zu Hilfenahme des TSA-

Enhancer-Kits möglich. Unter diesen Umständen erfolgte die Färbung bei transgenen Embryonen beider Konstrukte mit vergleichbarer Geschwindigkeit und Intensität.

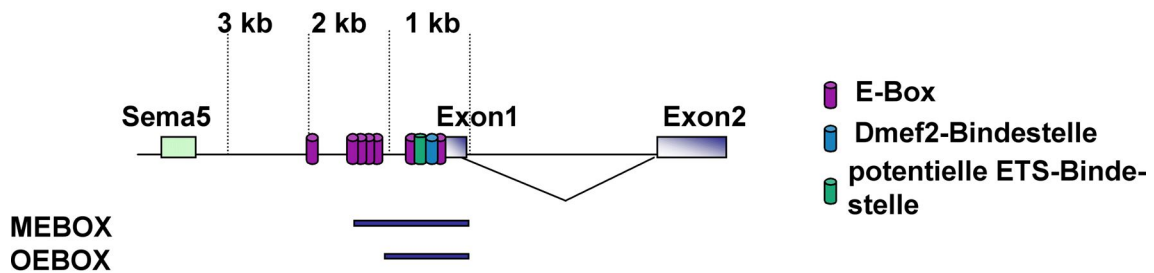


Abb. 4.2.3 Schematische Darstellung der *rols7*- Promotorregion mit den Konstrukten MEBOX und OEBOX

4.2.4 Ein 580 bp großes Fragment ist in der Lage eine zeit- und gewebespezifische Reporterexpression zu gewährleisten; wird dieses Fragment 5' um weitere 55 bp verkürzt ist keine spezifische Reporterexpression mehr nachweisbar

Zur weiteren Eingrenzung der putativen *rols7*-Promotor-Region wurden in Bezug auf das 1 kb-Fragment (ROPOE) 4 weitere verkürzte Konstrukte erstellt. Bei diesen handelt es sich um die Konstrukte ROPOH (580 bp), RMEFP (525 bp), ROPO2 (482 bp) und ROPO1 (368 bp). Sowohl das Konstrukt ROPOH als auch das Konstrukt RMEFP enthalten noch eine putative MEF2 Bindestelle (Vorhersage durch TFSearch); das Konstrukt ROPOH enthält zusätzlich eine durch TF-Search vorhergesagte ETS-Bindestelle. Die Konstrukte ROPO2 und ROPO1 enthalten weder die putative Mef2-Bindestelle noch die ETS-Bindestelle. Aufgrund der vorangegangenen RT-PCR Experimente zur Ermittlung der maximalen Länge der *rols7*-cDNA und somit der Bestimmung des Transkriptionsstarts (TSS) war davon auszugehen, dass das Konstrukt ROPO1 maximal 88 bp upstream des TSS enthält und minimal 23 bp upstream des TSS. Alle Konstrukte enthalten eine durch TFSearch vorhergesagte Nautilus-Bindestelle (E-Box) (s. Abb 4.2).

Für die PCR-Reaktion zur Amplifikation der DNA-Fragmente mit dem RPL-Konstrukt als Template, wurden die 5' Primer ROPOH, RMEFP, ROPO2 und ROPO1 verwendet. Als 3' Primer diente ROPRIUI. Die in pCRII TOPO zwischenklonierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und SpeI aus dem TOPO Vektor in den P-Element-Transformationvektor pChabΔSal überführt. An den transgenen Embryonen der so erzeugten Linien erfolgte der β-

Galactosidase Nachweis mittels eines polyklonalen α - β -Gal-Antikörpers und unter Verwendung des TSA- Enhancer Kits.

Embryonen mit einer Integration des ROPOH-Konstrukts im Genom zeigen eine der den längeren Konstrukten MEBOX, OEBOX und ROPOE entsprechende relativ schwache Reporter-Expression im somatischen Mesoderm; d.h. ab Stadium 10 in den Vorläufern der somatischen Muskulatur und später in der somatischen Muskulatur selbst, sowie im Dorsalgefäß (Abb. 4.2.4 A)

Bei Embryonen der Linien RMEFP, ROPO2 und ROPO1 kann auch mit zu Hilfenahme des TSA Kits keine spezifische Reporter-Genaktivität mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.2.4 B) Bei einigen Linien dieser Konstrukte können z.T. schwache Färbungen in unterschiedliche Gewebe beobachtet werden; vereinzelt (je 1 Linie RMEFP und eine ROPO2) auch in der somatischen Muskulatur. Daneben können Färbungen z.B. der SOP-Zellen (Sensory Organ Precursors, Abb. 4.2.4 C), des Fettkörpers und des Gonadenmesoderms gezeigt werden.

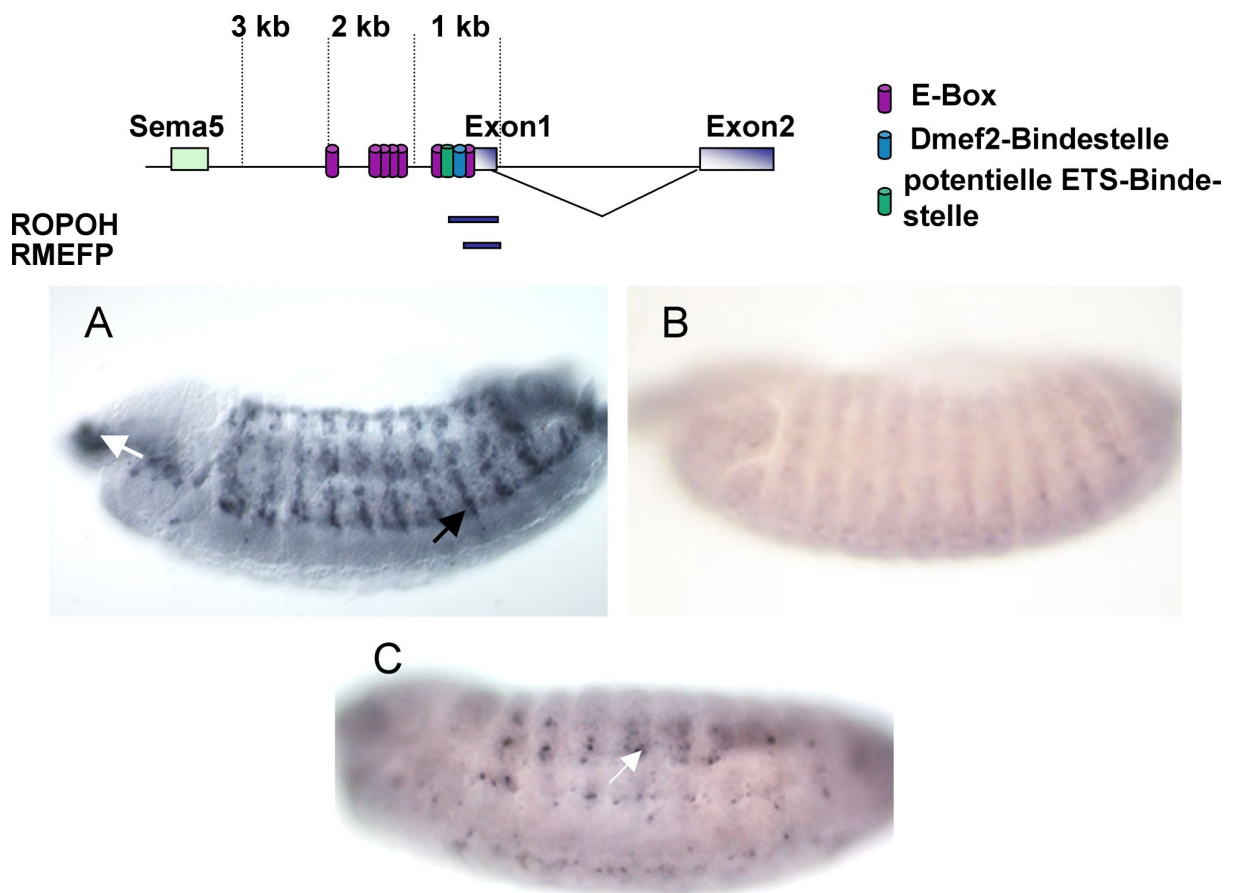
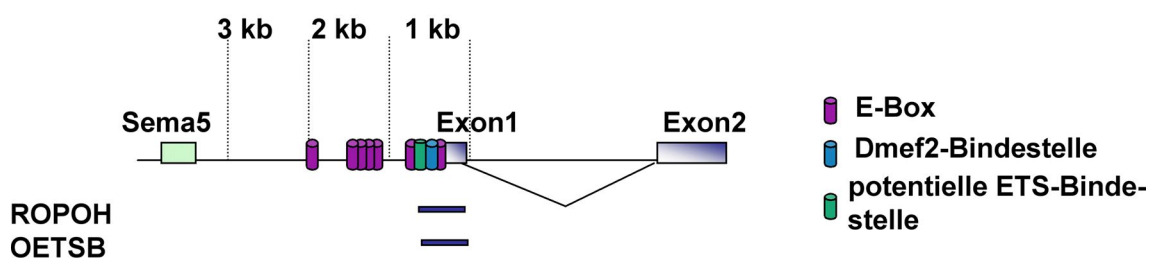


Abb. 4.2.4: Die Expression der Konstrukte ROPOH (A) und RMEFP (B und C) in transgenen Embryonen des Stadium 13. OETS-B ist in der Lage die Expression des Reportergens in den Muskel-Precursorzellen (schwarzer Pfeil) und der Pharynxmuskulatur (weißer Pfeil) zu steuern. Transgene Embryonen der RMEFP-Linie zeigen häufig keine Expression (B) oder eine Expression in Geweben wie den SOP-Zellen (C, weißer Pfeil)

4.2.5 Die vorhergesagte ETS-Bindestelle im putativen *rols7*-Promotor hat keine Funktion für die Reportergenexpression

Wie in Punkt 4.1.4 beschrieben wird im 5' Promotor-Bereich von *rols7* durch TF-Search eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (Core-Consensus GGAA) vorhergesagt. Da diese Bindestelle in dem funktionalen Konstrukt ROPOH enthalten ist, in dem lediglich 55 bp kürzeren, nicht mehr funktionalen Konstrukt RMEFP jedoch deletiert ist und aufgrund der Beobachtung, dass Mutationen im zur ETS-Familie gehörenden Gen *pointed* möglicherweise zu einem dem *rols*-Phänotyp ähnlichen Fusionsdefekt in der somatischen Muskulatur führen (s. Punkt 4.6.1 und Diskussion), erschien es sinnvoll die Funktionalität der ETS-Bindestelle zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde der 5' Primer OETSB abgeleitet und mit ROPRIUI als 3' ein 556 bp langes Fragment (Template: RPL) amplifiziert. Bis auf eine weitere Verkürzung des 5'-Bereichs um 24 bp entspricht das Konstrukt OETSB dem ROPOH-Konstrukt. Innerhalb der deletierten 24 bp befindet sich der größte Teil der mögliche ETS-Bindestelle inklusive der Core-Consensus-Sequenz (s. Anhang). Über den pCRII-TOPO-TA Vektor erfolgte die Ligation des Fragments über die Schnittstellen EcoRI und SpeI in den P-Element-Transformationvektor pChab Δ Sal und anschließend die Keimbahntransformation des Konstrukts in einen *white* Hintergrund. Der Antikörperrnachweis der β -Galactosidase erfolgte wie zuvor beschrieben unter zu Hilfenahme des TSA-Kits. Embryonal kann das Reportergen ab Stadium 10 in den Vorläufern der somatischen Muskulatur und im Pharynx nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Expressionshöhe der anderen kurzen Konstrukte (MEBOX, OEBOX, ROPOE und ROPOH) scheint das Expressionniveau noch einmal herabgesenkt zu sein. Eine Färbung in den fusionskompetenten Myoblasten zum Zeitpunkt der Kontaktaufnahme mit dem sich bildenden Muskel konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.2.5)



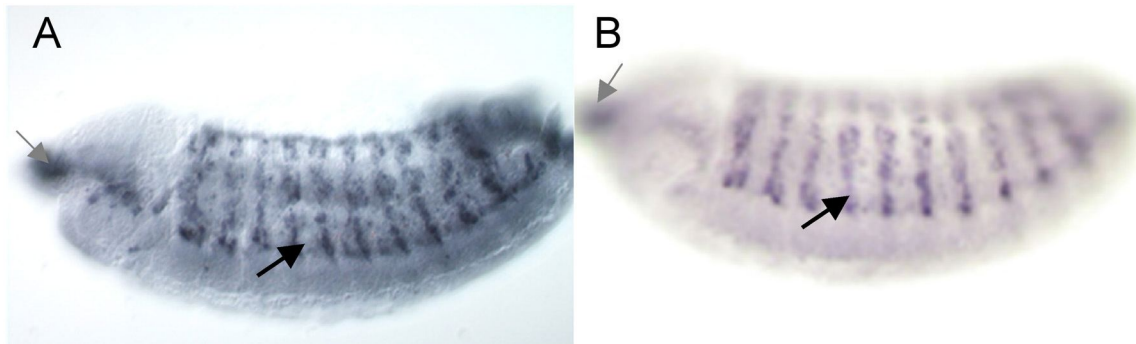
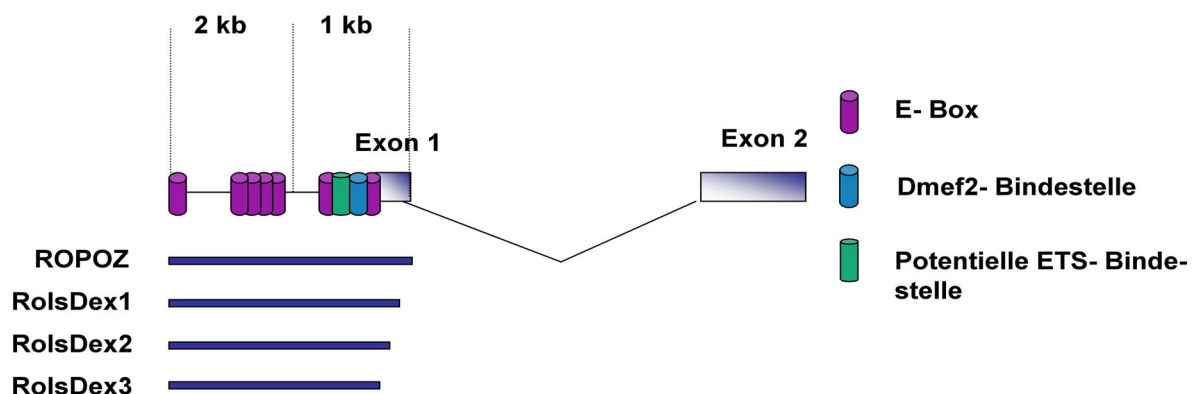


Abb.: 4.2.5: Die Reporterexpression von OETSB und ROPOH im Vergleich: Das Konstrukt OETSB (B) steuert in Embryonen des Stadium 13 eine mit der Expression des Konstrukts ROPOH (A) übereinstimmende Reporterexpression in den Muskelprecursorzellen (schwarzer Pfeil) und der Pharynxmuskulatur (grauer Pfeil)

4.2.6 3' Deletionen die 102, 215 und 318 Basenpaare des Leaders umfassen führen nicht zu einer Beeinträchtigung der Reporterexpression

Da Elemente zur Regulation von Transkription, mRNA-Stabilität oder Lokalisation sowie der Translation auch im Leaderbereich eines Gens lokalisiert sein können, wurden drei Konstrukte mit 3' Deletionen dieser Region erstellt und in pChab Δ Sal ligiert. Die Konstrukte RolsDex1, RolsDex2 und RolsDex3 stimmen bis auf die 84, 197 und 300 Basenpaare umfassende 3' Deletionen mit dem ROPOZ-Konstrukt überein (Abb. 4.2.6) (zur Amplifikation wurde jeweils der 5' Primer ROPRD verwendet; 3' kamen die Primer RolsDex1, RolsDex2 und RolsDex3 zum Einsatz, s. Anhang). Bei dem Antikörperrnachweis des Reportergens zeigen transgene Embryonen aller drei Deletionskonstrukte eine in mit ROPOZ in Expressionsmuster und Expressionsniveau übereinstimmende Reporterogenaktivität (s. Abb. 4.2.2).



Schematische Darstellung der *rols7*-Promotorregion mit den Konstrukten RolsDex1, 2 und 3:

Ausgehend von dem Konstrukt ROPOZ wurden bei RolsDex1 84 bp, bei RolsDex2 197 bp und bei RolsDex3 300 bp deletiert. Die Konstrukte deletieren dabei 102 bp (RolsDex1), 215 bp (RolsDex2) und 318 bp (RolsDex3) des Leaders

4.2.7 Ein 1.3 kb langes Fragment upstream von *rols7* ist in der Lage als Enhancer eine mesodermale Reporterexpression in transgenen Embryonen zu steuern

Aufgrund der beobachteten Unterschiede im Expressionsniveau der längeren Reportergenkonstrukte ROPOZ und RPL zu dem Expressionsniveau der kürzeren Konstrukte erschien die Lokalisation eines oder mehrerer Enhancer-Elemente, welche das Genexpressionniveau erhöhen, innerhalb der Promotorregion wahrscheinlich.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde ein 1365 bp langer Abschnitt der Promotorregion in den P-Element-Transformations-Vektor pH-Pelican kloniert. PH-Pelican besitzt ebenso wie pChab Δ Sal ein *white*-Gen als Marker für die Keimbahntransformation und ein *lacZ*-Gen als Reportergen. Im Unterschied zu pChab Δ Sal ist hier das *lacZ*-Gen mit einem basalen Hitzeschock Promotor mit TATA-Box und einem Transkriptionsstart gekoppelt. Dies ermöglicht es die Funktionalität von Enhancer-Elementen unabhängig von dem *in vivo* zugehörigen Core-Promotor zu untersuchen (unter der Voraussetzung das der jeweilige Enhancer mit einem TATA-Box Core-Promotor interagieren kann). Zusätzlich sind die Multiple Cloning Site und das *lacZ*-Gen von gypsy- Insulatoren flankiert, welche das Risiko minimieren, daß das Reportergen aufgrund von Enhancer-Traps transkribiert wird (Abb. 4.2.7 a)

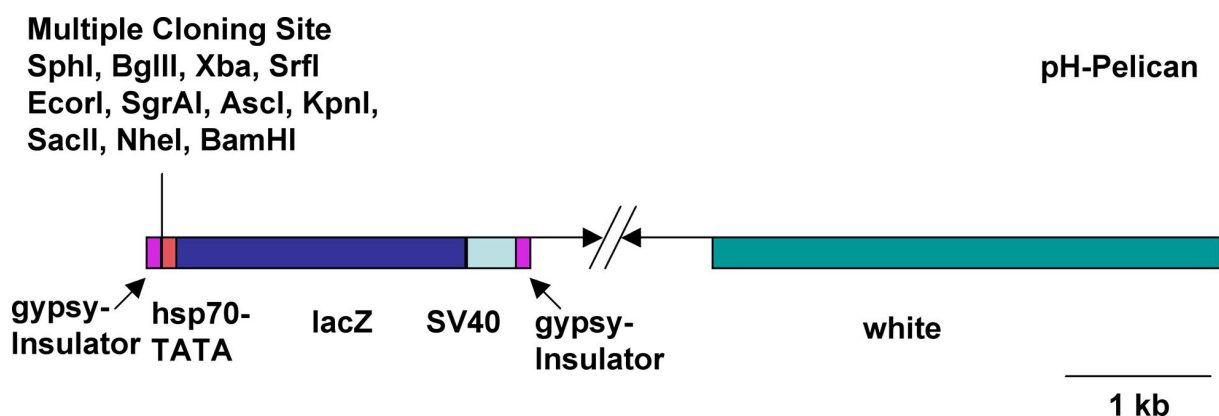


Abb. 4.2.7 a: schematische Darstellung des P-Element-Transformationsvektors pH-Pelican

Die Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts erfolgte durch die Primer ROPRD (5' Primer) und ROPOHR (3' Primer) (s. Anhang) mit RPL#2 als Template. Das in pCRII TOPO TA klonierte PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym

EcoRI aus dem TOPO Vektor ausgeschnitten und in den mit EcoRI geöffneten pH-Pelican Vektor ligiert. Durch die ungerichtete Klonierung konnte so jeweils ein Konstrukt mit einer Integration des DNA-Fragments in sense Richtung (Konstrukt PH 7) und eines mit der Integration in anti-sense Richtung (Konstrukt PH 10) erzeugt werden. Beide Konstrukte wurden in das Genom von *D. melanogaster*-Fliegen integriert. Anschließend wurde die Aktivität des Reportergens mit Hilfe einer Antikörperfärbung (polyklonaler α - β -Gal-Antikörper) dokumentiert. Die Linien beider Konstrukte zeigen ein übereinstimmendes Expressionsmuster des *lacZ*-Gens. Dies beginnt in Stadium 11 und beschränkt sich auf das somatische Mesoderm inklusive der Pharynxmuskulatur. Zunächst ist die Expression ventral stärker ausgeprägt als dorsal; außerdem exprimieren zunächst vermehrt Zellen in anterioren Segmenten das Reportergen (Abb. 4.2.7b B) Später ist die Reportergenexpression gleichmäßig in den Vorläufern der somatischen Muskulatur beobachtbar und persistiert bis ins Stadium 16. Zur Kontrolle wurden Embryonen mit einer Integration des leeren pH-Pelican Vektors ins Genom gefärbt. Embryonen mit einer Integration des pH-Pelican Vektors weisen ab Stadium 9/10 bis Stadium 17 eine starke Reportergenaktivität in den Zellen des hämatopoitischen Systems auf. Hinzu kommt die Expression des Reportergens in Zellen des peripheren Nervensystems (Daten nicht gezeigt).

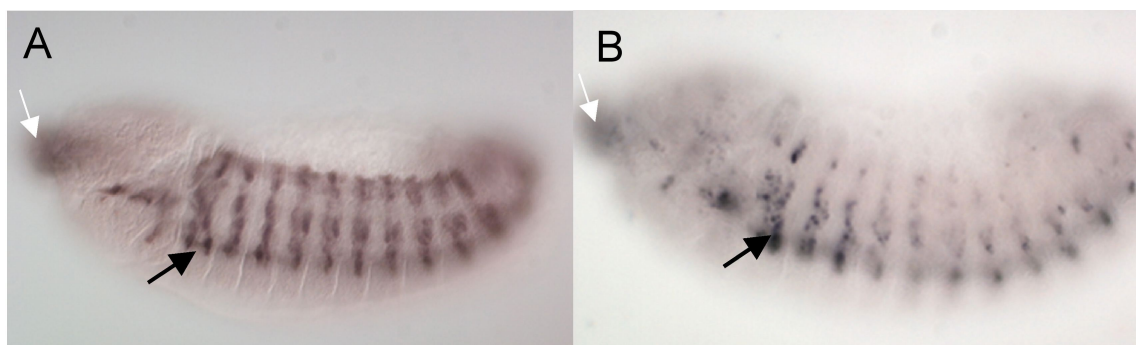
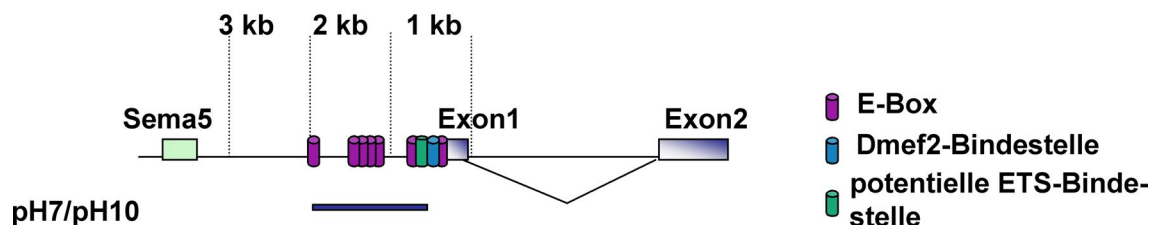


Abb. 4.2.7b: Die Expression des Enhancerkonstrukts pH7 (B) im Vergleich zur Reportergenexpression in Embryonen des Stadium 13 des Konstrukt ROPOZ (A). Wie bei transgenen Embryonen der Linie ROPOZ zu beobachten steuert das Enhancerkonstrukt pH7 eine Expression in Muskel- Precursorzellen (schwarzer Pfeil) und im Pharynxmuskel (weißer Pfeil); im Gegensatz zu ROPOZ erfolgt die Reportergenexpression nicht gleichmäßig in allen Precursorzellen

4.2.8 Die Regulation der viszeralen Expression von *rols7* erfolgt über Enhancer- Elemente die im 1. Intron des *rols*- Gens lokalisiert sind

Da in der 5'-Promotorregion des *rols7*-Transkripts kein Regulationselement für die beobachtete *rols7*-Transkription in der viszeralen Muskulatur identifiziert werden konnte, erschien es wahrscheinlich, dass 3' Transkriptionsstarts lokalisierte Elemente die viszerale *rols*-Expression steuern. Aus diesem Grund wurde das erste Intron des *rols*-Gens auf das Vorhandensein von Enhancerelementen getestet. Hierzu wurden transgene Fliegen die das Konstrukt Roln1 mit dem gesamten 1. *Ro/s* Intron in dem Enhancertest Vektor pChabHsp43 ins Genom integriert hatten (das verwendete Konstrukt wurde freundlicherweise von Susanne Berger zur Verfügung gestellt) auf ihre Expression des lacZ- Reportergens überprüft.

Multiple Cloning Site

EcoRI, KpnI, SmaI, XmaI,

SacII, NotI, SpeI, BamHI, XbaI, Sall, XhoI

pCaSpeRhs43

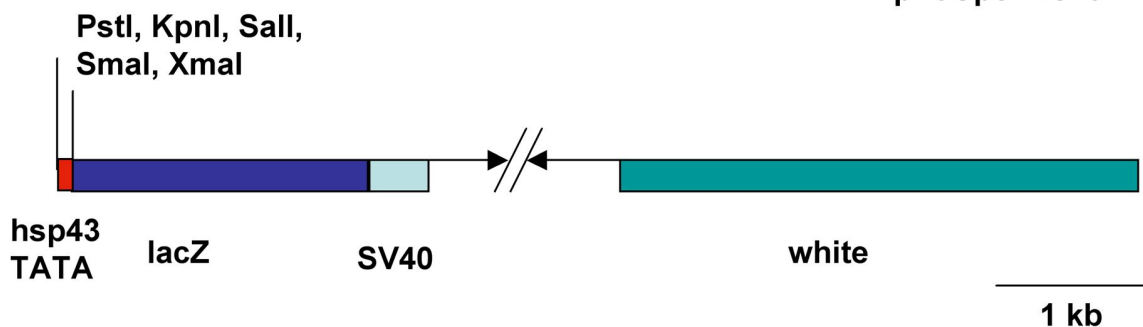


Abb. 4.2.8 a: schematische Darstellung des P-Element-Transformationsvektors pCaSpeRhs43

Ab Stadium 10 kann die Expression des Reportergens sowohl in den Vorläufern der zirkulären als auch der longitudinalen viszeralen Muskulatur nachgewiesen werden (Abb 4.2.8b A+ B). Zusätzliche Färbemuster finden sich in Zellen der Amnioserosa und in den malphigischen Gefäßen, sowie einem Subset der somatischen Muskulatur (Daten nicht gezeigt und Abb. 4.2.8b B). Zur Kontrolle wurden Embryonen mit einer Integration des leeren pChabHsp43-Vektors gefärbt. Dabei zeigten zwei von drei unabhängigen Linien eine Reportergenexpression in den Vorläufern der longitudinalen viszeralen Muskulatur und in einem Subset der Malphigizellen (Daten nicht gezeigt).

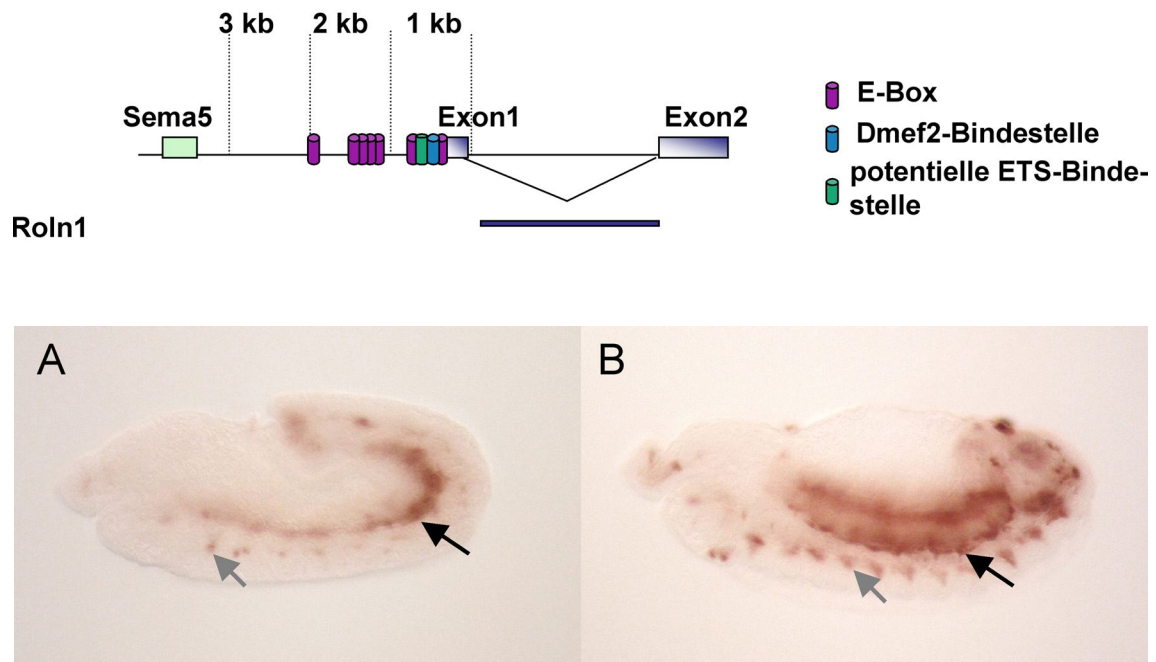


Abb. 4.2.8b: Die Reporterexpression transgener Roln1-Embryonen: Im Stadium 11 (A) weisen die Embryonen eine Reporteraktivität in den Vorläufern der circulären visceralen Muskulatur (schwarzer Pfeil) und in Teilen der somatischen Muskulatur (grauer Pfeil). In Stadium 13 (B) ist die Reporter-Expression in der longitudinalen visceralen Muskulatur zu beobachten (schwarzer Pfeil).

4.2.9 *in situ* Hybridisierungen sowohl mit einer *rols6* und *rols7* dedektierenden 3'-Sonde als auch einer *rols7* spezifischen Sonde zeigen, dass *rols7* auch in den Vorläufern der longitudinalen visceralen Muskulatur exprimiert wird.

Aufgrund der Beobachtung, dass das Konstrukte mit dem 1. Intron von *rols7* neben einer Expression des Reportergens in der zirkulären visceralen Muskulatur auch eine Expression in der longitudinalen visceralen Muskulatur steuert und unklar ist, ob diese auf den verwendeten Vektor pChabHsp43 zurückzuführen ist, wurden erneut *rols in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Verwendet wurde eine *rols6* und *rols7* dedektierende 3'-Sonde (hierfür wurde ein *D. melanogaster rols* cDNA Klon in Bluescript mit PstI geöffnet und die c-terminalen 2 kb mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert) und eine *rols7* spezifische Sonde (verwendet wurde ein TOPO-Klon mit der 1 kb der *rols7* spezifischen DNA Sequenz enthält; dieser würde mit XbaI geöffnet und mit der T7-Polymerase transkribiert). Neben den bereits beschriebenen Expressionsmustern können beide Sonden ein Transkript in der longitudinalen visceralen Muskulatur und deren Vorläufer nachweisen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich die Transkription von *rols7* im Stadium 10 im

viszeralem Mesoderm auch auf die FCMs der zirkulären viszerale Muskulatur erstreckt (Abb. 4.2.9)

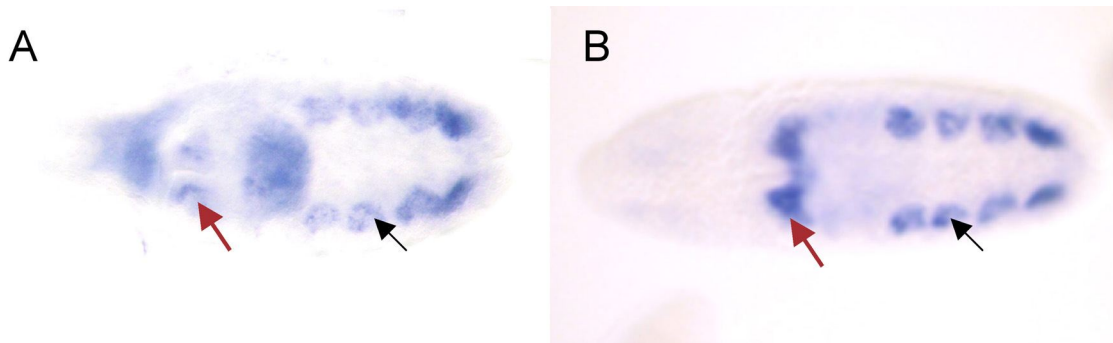


Abb.4.2.9: Die *rols7*-Transkription im viszeralem Mesoderm: Das *rols7*-Transkript kann mit einer 3' (A) und einer 5'-Sonde (B) in den Vorläufern der longitudinalen (roter Pfeil) und der zirkulären (schwarzer Pfeil) viszerale Muskulatur nachgewiesen werden. Aufgrund der Breite der Expressionsdomäne der zirkulären Muskulatur ist davon auszugehen, dass *rols7* sowohl in den Founder- als auch in den fusionskompetenten Myoblasten transkribiert wird.

4.3 Die Analyse der putativen Promotoregion des *rols*-Gens bei *D. pseudoobscura*

Neben den codierenden Sequenzen unterliegen auch die regulativen Sequenzen einer evolutionären Selektion- d.h. aufgrund ihrer Funktion als Proteinbindestelle können Basenaustausche in diesem Bereich zu einem Funktionsverlust der Bindestelle führen und somit kann es zum Ausfall oder zur Überexpression des durch sie regulierten Gens kommen. Dies hat zur Folge, dass die Mutationsrate von regulativen Elementen niedriger ist als die der umliegenden, nicht funktionalen DNA-Regionen. Da davon auszugehen ist, dass bei einer ausreichenden evolutionären Distanz Sequenzähnlichkeiten von nicht codierenden und nicht regulierenden Sequenzen minimiert werden, kann dies z.B. genutzt werden, um durch einen Sequenzvergleich von nicht zu nah verwandten Spezies konservierte regulative Elemente in der putativen Promotorregion zu identifizieren. Zur Identifikation der Transkriptionsfaktorbindestellen des *rols7*-Gens erschien ein ähnliches Vorgehen sinnvoll. Zunächst sollte mit Hilfe einer *rols*-spezifischen DNA-Sonde (verwendet wurde ein 2.2 kb großes Fragment, dass mit Hilfe der Primer LDA5neu und LDI20 mit der *rols7*-cDNA als Template in einer PCR-Reaktion amplifiziert wurde) das *rols*-Gen von *Drosophila virilis* aus einer genomischen Bank dieser Spezies isoliert werden, um anschließend durch überlappende genomische Klone die zugehörige Promotorregion zu identifizieren. In mehreren durchgeführten Phagen- Screens

gelang es jedoch nicht einen *rols*-homologen Klon zu isolieren und somit Zugang zur Promotorregion zu erlangen. Neben den bereits erwähnten Arten *D. hydei* und *D. virilis* ist *D. pseudoobscura* eine weitere Art, welche zum Vergleich von codierenden und regulativen Sequenzen geeignet ist. Sie gewährleistet eine ausreichende evolutionäre Distanz zu *D. melanogaster* (ca. 25 Millionen Jahre), um zufällige Sequenzähnlichkeiten zu minimieren, dabei ist sie jedoch noch so nah mit *D. melanogaster* verwandt, dass eine größere Anhäufung von Mutationen in den funktionalen Elementen des Genoms unwahrscheinlich ist.

Im Rahmen eines vom Baylor College of Medicine durchgeführten Genomprojekts wurde das Genom von *D. pseudoobscura* bis auf wenige noch vorhandene Lücken vollständig sequenziert und 2004 veröffentlicht (Richards et al., 2005). Neben dem *D. melanogaster*-Genom handelt es sich bei dem Genom von *D. pseudoobscura* zur Zeit um das einzige *Drosophiliden*-Genom, dass vollständig zugänglich ist und zum evolutionären Vergleich herangezogen werden kann.

4.3.1 Das *rols*-Gen ist in *Drosophila pseudoobscura* konserviert und wird in einem übereinstimmenden räumlichen und zeitlichen Muster transkribiert

Ein Alignment des *rols*-Gens mit dem Genom von *Drosophila pseudoobscura* identifiziert eindeutig ein *rols* orthologes Gen mit einem Homologiegrad von ca. 70% auf Nukleotidebene (UCSC Genome Browser v77 with VISTA tracks). Sowohl die codierenden Exons von *rols6* als auch *rols7* sind stark konserviert; die nicht codierenden 1. Exons der beiden Transkripte sind weniger homolog, allerdings können auch hier noch homologe Sequenzblöcke identifiziert werden. Das *rols7* orthologe Transkript trägt die Bezeichnung GA16675-RA und codiert für ein zu Rols7 80% identisches Protein.

In situ – Hybridisierungen mit einer 3' gelegenen *rols*-RNA-Sonde (hierfür wurde ein *D. melanogaster rols* cDNA Klon in Bluescript mit PstI geöffnet und die 3' gelegenen 2 kb mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert) zeigen, dass das *Drosophila pseudoobscura rols*-Gen in einem mit dem für *D. mel/rols* übereinstimmenden räumlichen und zeitlichen Muster transkribiert wird. Zu Beginn kann die *rols* mRNA im Stadium des voll verlängerten Keimstreifs im posterioren und anterioren Mitteldarmprimordium (AMG und PMG) dedektiert werden (Abb. 4.3.1 A) Ebenfalls noch im Stadium des verlängerten Keimstreifs kann das Transkript im Mesoderm

nachgewiesen werden (Abb. 4.3.1 B). Es handelt sich hierbei um die Vorläufer der somatischen Muskulatur, der viszeralen Muskulatur (zirkulär und longitudinal) und der Pharynxmuskulatur (Abb. 4.3.1 B + C). Ab dem Dorsalschluss ist die *rols* mRNA in den mesodermalen Geweben nicht mehr nachweisbar. Mit der Anlage der Knospen für die Malphigie-Gefäße (beginnender Keimstreifrückzug) wird sichtbar, dass in diesem Gewebe das *D. pseudoobscura* *rols*-Gen ebenfalls transkribiert wird. Hier kann eine Färbung bis Stadium 14 beobachtet werden; dies gilt auch für das aus AMG und PMG hervorgehende Entoderm. In späteren Stadien kann *rols* zusätzlich im Pharynx nachgewiesen werden (s. Abb.4.3.1 D)

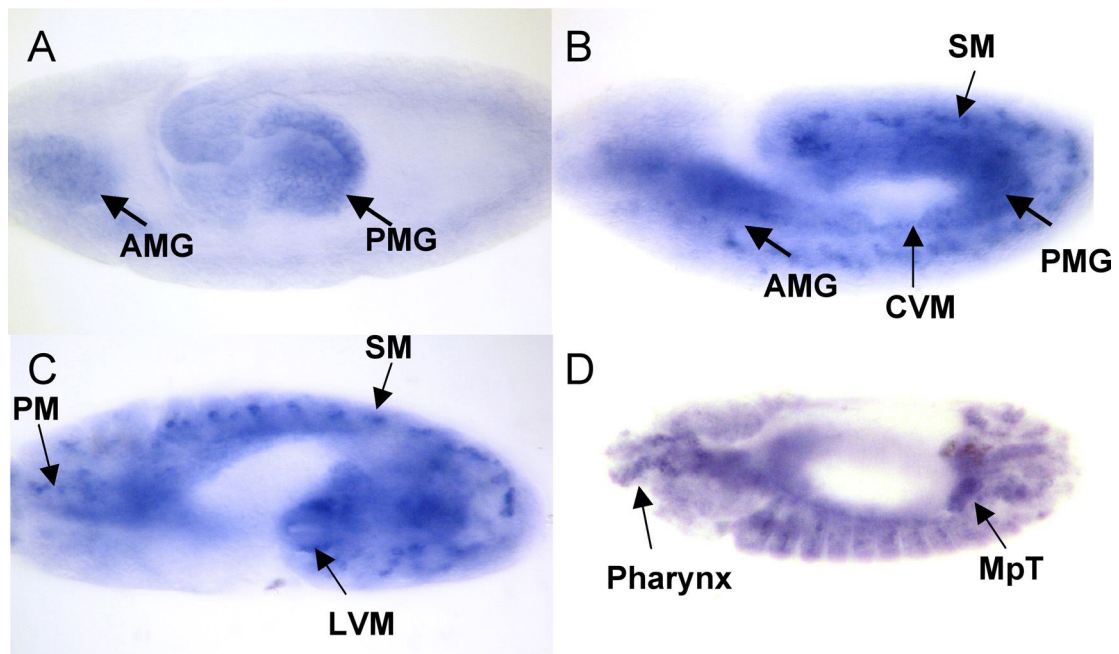


Abb. 4.3.1: Die *rols*- Expression in Embryonen von *D. pseudoobscura*: mit Hilfe einer 3' *rols*-mRNA Sonde kann in *D. pseudoobscura*-Embryonen der Stadien 11 (B), 12 (C) und 13 ein *rols7* entsprechendes Transkript in der somatischen (SM), der Pharynx- (PM) der zirkulären (CVM) und der longitudinalen (LVM) viszerale Muskulatur nachgewiesen werden. Ein *rols 6* entsprechendes Transkript kann bereits ab Stadium 9 (A) in AMG und PMG nachgewiesen werden, später kommt eine Expression in den Malphigie-Gefäßen (MpT) und im Pharynx hinzu. Da die Embryonalentwicklung von *D. pseudoobscura* langsamer abläuft als die von *D. melanogaster* erfolgte die Einteilung der Stadien ausschließlich anhand der fast vollständig übereinstimmenden Morphologie mit *D. melanogaster*.

4.3.2 Die putative Promotorregion des Transkripts GA16675-RA (*Drosophila pseudoobscura* *rols7*) ist in der Lage in transgenen Embryonen der Spezies *D. melanogaster* eine zeit- und gewebespezifische Reportergenexpression zu initiieren

Bei einem Sequenzvergleich der Promotorregion von *rols7* mit der Promotorregion von GA 16675-RA zeigt sich, dass die 5' Promotorregion des Gens bei den zwei Spezies relativ stark divergiert. So weist z.B. die mit dem ROPOZ- Konstrukt (s.

Punkt 4.1.2) von *D. melanogaster* vergleichbare *D. pseudoobscura* Sequenz zahlreiche, bis 100 bp umfassende Lücken auf. Aufgrund der Versuche zur regulativen Funktion des *rols7*-Promotors bei *D. melanogaster* hatte sich gezeigt, dass ein 556 bp umfassendes Fragment ausreichend ist, um eine spezifische Expression des *lacZ*-Reportergens zu gewährleisten. Vergleicht man diesen 556 bp großen Abschnitt mit der entsprechenden Sequenz von *D. pseudoobscura* sind mehrere konservierte DNA-Blöcke vorhanden. Der längste Block umfasst 37 identische Nukleotide im Bereich der ETS-Box und ist 5' der putativen Mef2-Bindestelle lokalisiert. Die Mef2 Bindestelle selbst ist ebenfalls weitgehenden konserviert. Weitere konservierte Blöcke sind weiter 3' lokalisiert und liegen z.T. bereits im Bereich der mit der *rols7* LDcDNA übereinstimmt (Abb. 4.3.2 a).

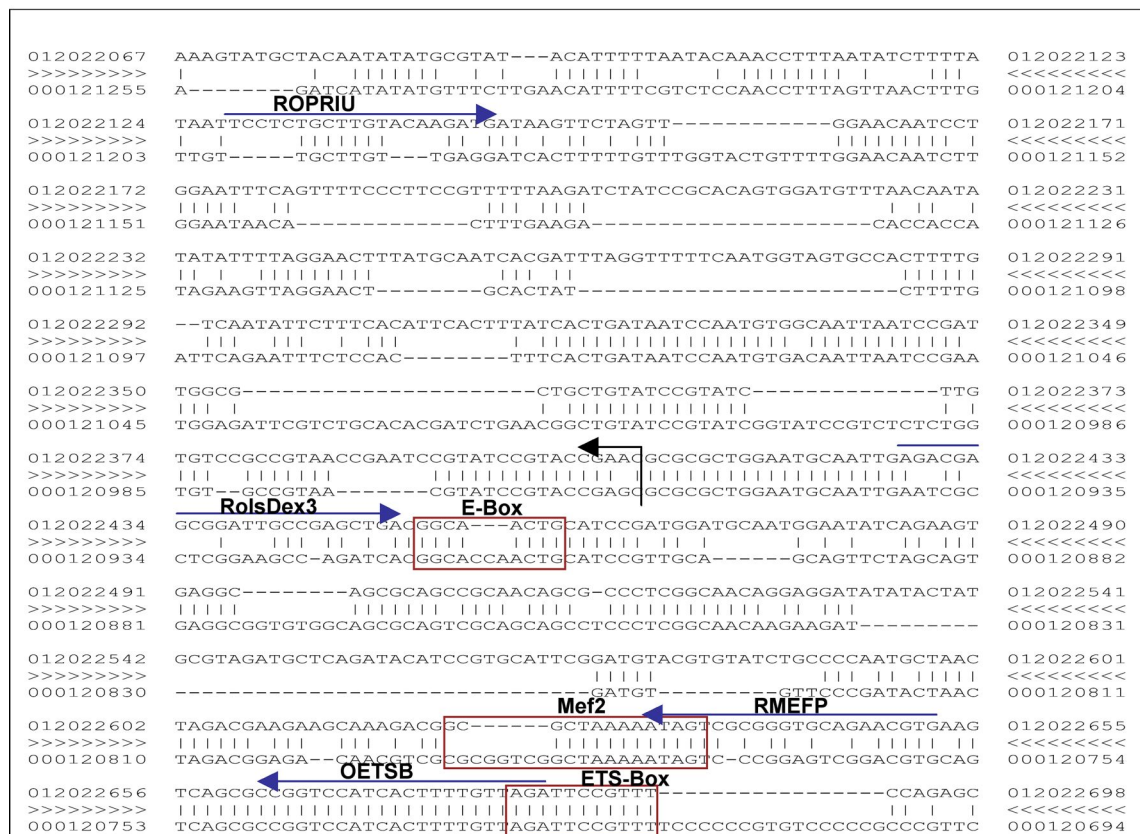


Abb. 4.3.2 a: Ausschnitt des Alignments der genomischen *rols*-Sequenz von *D. melanogaster* (obere Sequenz) mit dem *D. pseudoobscura*-Genom (untere Sequenz) durch den UCSC Genome Browser. Es handelt sich bei dem dargestellten Bereich um den putativen *rols7*-Promotors; eingezeichnet ist ein Teil zur Herstellung der Promotorkonstrukte verwendeten Primer, die Mef2-Box und das 5'-Ende der LDcDNA (Schwarzer Pfeil). Aufgrund der Verwendung des Original-Alignments ist die Darstellung revers- komplementär zu weiteren gezeigten Darstellungen des *rols7*-Promotorbereichs.

Um zu überprüfen ob die zu beobachtenden Sequenzähnlichkeiten Rückschlüsse auf vergleichbare regulatorische Fähigkeiten der DNA-Abschnitte zulassen wurde mit

Hilfe der Primer ROPOH und Pseudo3' und genomischer *Drosophila pseudoobscura* DNA als Template ein 477 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen EcoRI und SpeI in den P-Element-Transformationvektor pChab Δ Sal ligiert. Das so erzeugte Konstrukt OETSBps ist analog zu dem 556 bp langen in Punkt 4.1.5 beschriebenen OETSB-Konstrukt. Nach der Keimbahntransformation des Konstrukts in *D. melanogaster* erfolgte der Nachweis der Reportergenexpression mit dem polyklonalen α - β -Gal-Antikörper. Die Abb. 4.3.2b zeigt einen Vergleich der Reportergenexpression des aus *D. melanogaster* stammenden Reportergenkonstrukt OETSB (A) mit dem aus *D. pseudoobscura* stammenden OETSBps (B).

Ab Stadium 10 kann die Reportergenexpression in den Vorläufern der somatischen Muskulatur und der Pharynxmuskulatur nachgewiesen werden. Die Expression persistiert auf einem relativ hohen Niveau bis zum Stadium 16. Eine Reportergenexpression in der viszeralen Muskulatur, dem Dorsalgefäß oder den fusionskompetenten Myoblasten ist nicht zu beobachten.

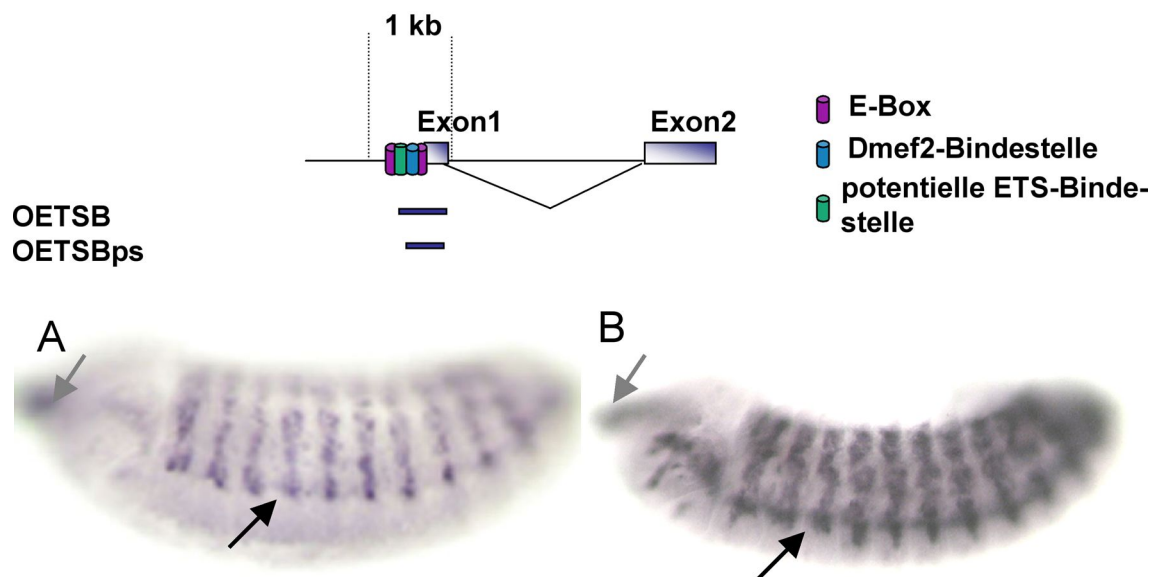


Abb. 4.3.2b: Die Reportergenexpression von OETSBps: Der Nachweis der Reportergenexpression in transgenen *D. melanogaster*-Embryonen (Stadium 13) mit dem Konstrukt OETSBps (B) im Vergleich zu Embryonen mit dem Konstrukt OETSB (A) zeigt, dass die *D. pseudoobscura*- Sequenz eine mit der *D. melanogaster*-Sequenz übereinstimmende Reportergenexpression in den Muskel-Precursorzellen (schwarzer Pfeil) und im Pharynx steuert.

4.3.3 Die putative Promotorregion des Transkripts GA16675-RB (*D. pseudoobscura ro/s6*) ist in der Lage in transgenen Embryonen der Spezies *D. melanogaster* eine zeit- und gewebespezifische Reportergenexpression zu initiieren

Für das *ro/s6*-Transkript von *D. melanogaster* wurde bereits beschrieben, dass ein 1.1 kb umfassendes Fragment (amplifiziert mit den Primern ROSHP2 und ROSHPI) upstream des Transkriptionsstarts ausreichend ist, um die spezifische Transkription von *ro/s6* im Entoderm, in den Malphigi-Gefäßen und im Pharynx zu gewährleisten (Abb.4.3.3a). Ein 1.6 kb umfassendes Konstrukt zeigte ein entsprechendes Expressionsmuster. Ein entodermaler Enhancer wurde in einer 479 bp umfassenden Region –332 bis –811 (ROSHPI-280) upstream des Transkriptionsstart identifiziert. Ein Promotorkonstrukt, das 692 Basenpaare (Primer ROSHP2 und ROSHP1-410) upstream des Transkriptionsstart umfasst, zeigt keine Reportergenaktivität mehr (Michael Pütz, 2004) und beschränkt somit die Lokalisation des entodermale Enhancers auf ein ca. 130 bp umfassendes Fragment innerhalb der 479 bp. Vergleicht man die Promotorregion von *ro/s6* mit der putativen Promotorregion des *ro/s6*-Gens bei *D. pseudoobscura* (dieses ist bisher nicht annotiert, die Existenz des Transkripts konnte jedoch aufgrund der vorangegangenen *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden und wird analog zur GA-16675 RA mit GA-16675 RB bezeichnet) können mehrere sequenzhomologe Blöcke identifiziert werden. Allerdings ist zu beobachten, dass in den vermutlich für die Regulation entscheidenden Bereichen zwischen –692 bis –811 (entodermale Enhancer) und –811 bis –1.1 kb (Regulation der Expression in den Malphigie-Gefäßen) die Homologie relativ niedrig ist und keine längere Sequenzblöcke konserviert sind (Abb 4.3.3 a).

[illegible]

Abb. 4.3.3 a: Ausschnitt des Alignments der genomischen *rols*- Sequenz von *D. melanogaster* (obere Sequenz) mit dem *D. pseudoobscura*-Genom (untere Sequenz) durch den UCSC Genome Browser. Dargestellt ist der putative *rols6*-Promotor mit dem Transkriptionsstart bei +1 und den Primern die zur Amplifikation des 1.1 kb-Fragments (ROSHP1 und ROSHP2), des 811 bp großen Fragments (ROSHPI-280 und ROSHP2) sowie des 692 bp (ROSHPI-410 und ROSHP2) verwendet wurden. Aufgrund der Verwendung des Original-Alignments handelt es sich um eine revers-komplementäre Darstellung

Um zu überprüfen ob auch das *rols6*-Transkript von *D. melanogaster* ähnlich reguliert wird wie das GA 16675-RB Transkript von *D. pseudoobscura* wurde ein ca. 1430 bp großes Fragment (ROSH1Aps) mit Hilfe der Primer ROSHP2ps 3' und ROSHP1Aps 5' und genomischer *D. pseudoobscura* DNA als Template amplifiziert (Abb. 4.3.3a) und in den P-Element-Transformationvektor pChabΔSal ligiert. Nach der Keimbahntransformation in *D. melanogaster* erfolgte der Nachweis des Reportergens mittels Antikörperfärbung. Obwohl die Expressionshöhe des Reportergens relativ niedrig ist, kann das Reportergen sowohl in AMG und PMG (und dem daraus hervorgehenden Endoderm) sowie in den Malphigie-Gefäßen nachgewiesen werden. Die Expression beginnt im Stadium 9 und dauert an bis zum Stadium 14 (Abb 4.3.3 b A+B).

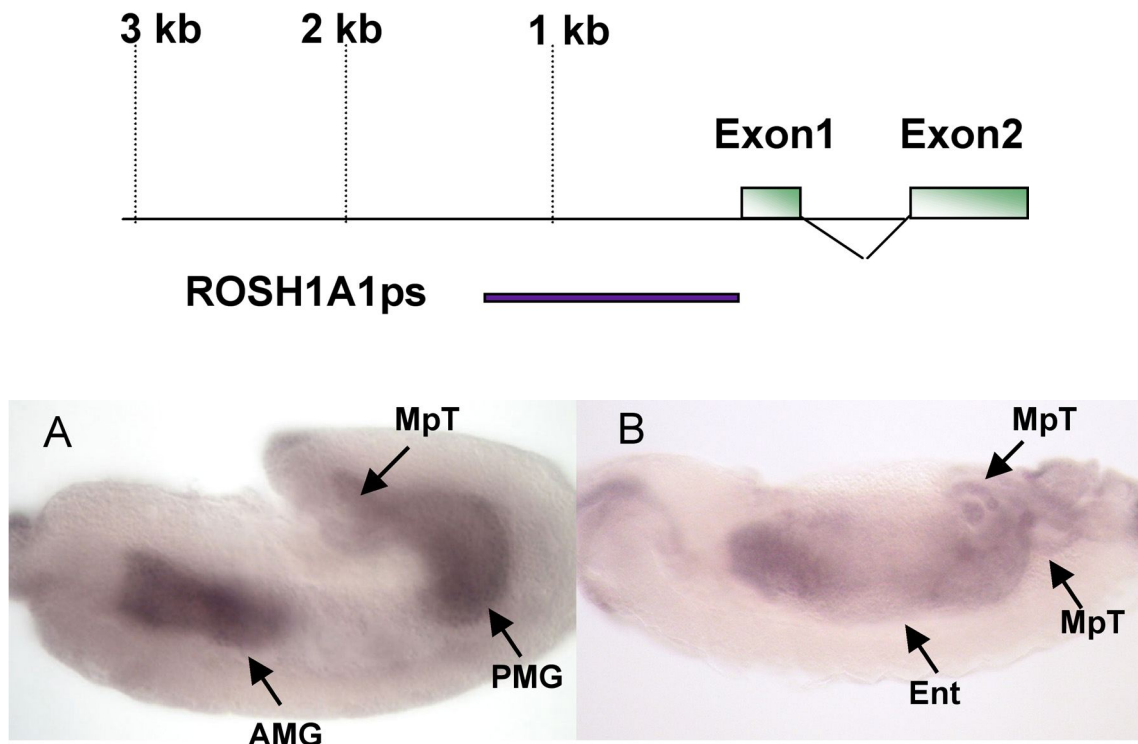


Abb. 4.3.3 b: Der Nachweis der lacZ-Reportergenexpression in transgenen Embryonen des Konstruktes ROSH1Aps: das Konstrukt ROSH1Aps (oben in einer schematischen Darstellung des *rols6*-Promotors skizziert) steuert die Reportergenexpression in AMG und PMG und den Anlagen der Malphigiegefäße (MpT) steuert. A: Stadium11/12, B: Stadium14.

4.3.4 Die vergleichende Analyse der funktionalen Promotorregionen von *rols6* und *rols7* zur Identifikation konservierter Transkriptionsfaktorbindestellen durch zPicture und rVista 2.0

Zur Identifikation konservierter cis- regulatorischer Elemente wurde ein 1 kb umfassendes Fragment upstream der 1. Base der längsten *rols7* cDNA des funktionalen *D. melanogaster* *rols7*-Promotors (Abb. 4.3.4) mit dem homologen Fragment des *D. pseudoobscura*-Genoms mit Hilfe der Programme zPicture und rVista verglichen und die Verteilung bekannter, konservierter Transkriptionsfaktorbindesstellen analysiert. Im Falle von *rols6* wurden 1.1 kb des funktionalen *D. melanogaster*-Promotors mit 1.1 kb der *D. pseudoobscura* Promotorregion verglichen.

Hierbei wurden neben Transkriptionsfaktorbindestellen von bei Insekten identifizierten Faktoren auch aus Vertebraten- und Nematodensystem bekannte Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen berücksichtigt, da für zahlreiche dieser Faktoren homologe Proteine innerhalb der *Drosophiliden* identifiziert werden können. Unter diesen Bedingungen werden beim Alignment der *rols7*-Promotorregion von *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* 42 konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert (s. Abb. 4.3.4). Von diesen 42 Bindestellen liegen 11 innerhalb der durch die Konstrukte OETSB und Rolsdex3 begrenzten Promotor-Region. Zu den konservierten Bindestellen gehört z.B. die auch durch TF-Search identifizierte Mef2-Box. Eine weitere Bindestelle für ein mesodermrelevantes Protein ist die NFR1-Bindestelle; von dem *Drosophila*-Homolog Erect Wing ist bekannt, dass dieser Faktor in die adulte Myogenese involviert ist. Eine ETS-Bindestelle wird im Rahmen dieses Alignments nicht vorhergesagt, obwohl TF-Search eine putative ETS- Site sowohl in der *D. melanogaster*-Sequenz als auch in der *D. pseudoobscura*-Sequenz lokalisiert.

Beim Alignment der *rols6*-Promotorregion werden durch zPicture und rVista keine signifikanten Sequenzhomologien und somit keine konservierten Transkriptionsfaktorbindestellen gefunden.

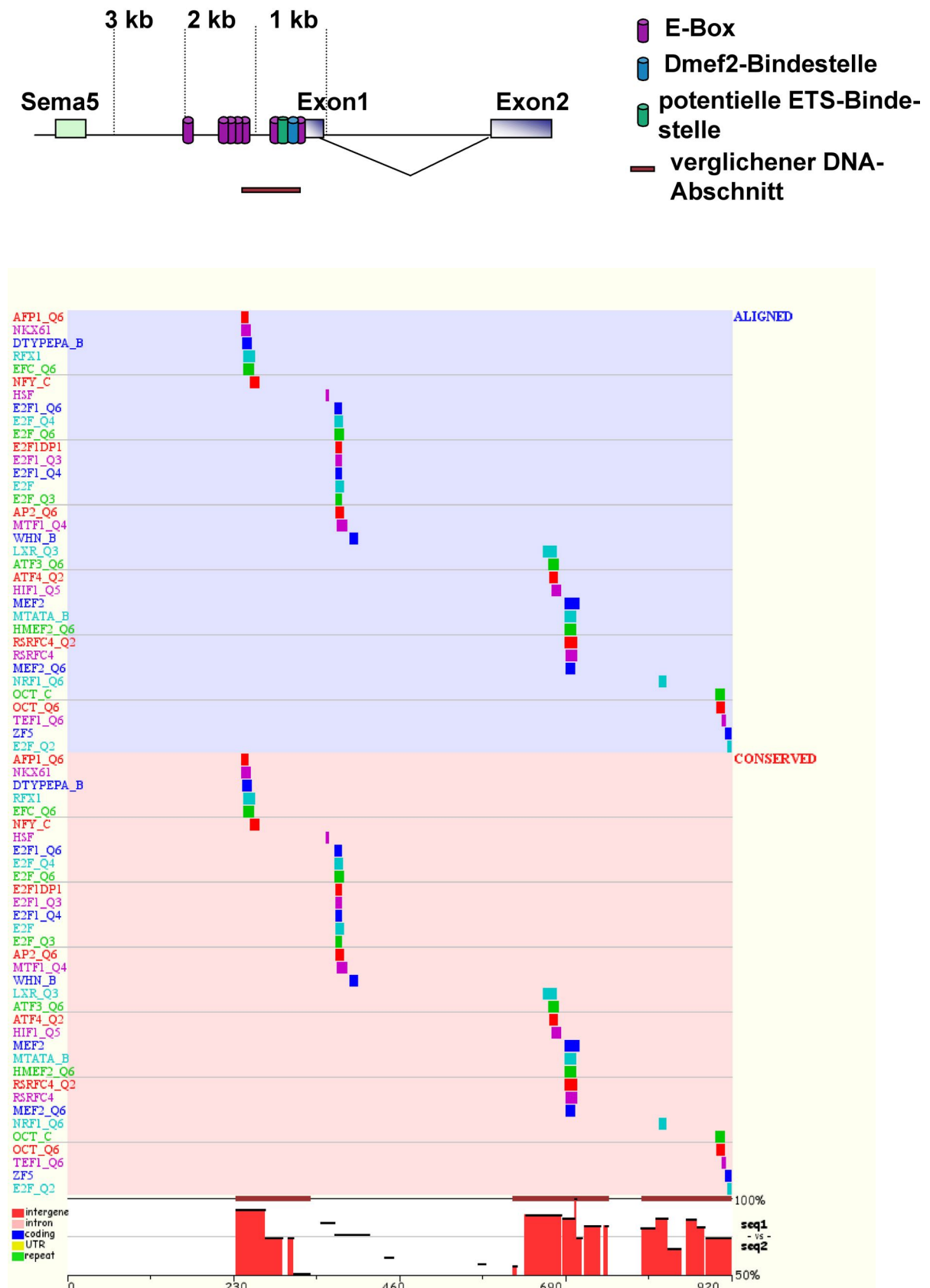


Abb. 4.3.4 rVista-Alignment: Darstellung des Alignments und der konservierten Transkriptionsfaktorbindestellen der *rols7*-Promotorregion von *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* unter Verwendung von zPicture und rVista

| | | | |
|---|------------------------------------|-------|--------------------------|
| Transkriptionsfaktorbindestelle | Transkriptionfaktor-Homolog | bei | <i>D. melanogaster</i> |
| ATF3_Q6 Activating Transcription Factor | Kayak | | |
| 3 | | | |
| ATF4_Q2 Activation Transcription Factor | cryptocephal | | |
| 4 | | | |
| HIF1_Q5 Hypoxia Inducible Factor 1 | Similar (α -Untereinheit); | Tango | (β -Untereinheit) |
| LXR_Q3 | Ecdyson Rezeptor | | |
| MTATA_B | TBP | | |
| NRF1_Q6 Nuclear Respiratory Factor | Erected Wing | | |
| Hmef2_Q6 | Dmef2 | | |
| Mef2 | Dmef2 | | |
| Mef2_Q6 | Dmef2 | | |
| RSRFC4_Q2 | Blistered | | |
| RSRFC4 | Blistered | | |

Tabelle 4.3.4: Transkriptionsfaktorbindestellen und die zu den bindenden Transkriptionsfaktoren homologen *Drosophila*- Proteine

4.4 Die Identifikation des Faktors eIF3-S10 als ein im *rols7*-Promotorbereich bindendes Protein durch einen Binding-Site Screen

4.4.1 Im Binding Site Screen wurde eIF3-S10 als ein im *rols7*-Promotorbereich bindendes Protein gefunden

Um den Regulationsmechanismus dem ein Gen unterliegt zu verstehen, ist neben der Identifikation der cis-regulatorischen Elemente, die Identifikation der an sie bindenden transregulatorischen Faktoren essentiell. Die spezifische Bindung von reprimierenden und aktivierenden Transkriptionsfaktoren macht eine koordinierte Genexpression erst möglich. Bisher wurden erst wenige Transkriptionsfaktoren beschrieben die in der Myogenese eine Rolle spielen und von diesen scheint keiner in die Regulation von *rols7* involviert zu sein (s. Punkt 4.5). Auch die Analyse der im

rols7-Promotor vorhergesagten Bindestellen liefert kaum Hinweise auf an der Regulation beteiligten Faktoren. Aus diesem Grund wurden zwei Ansätze zur Identifikation von transregulatorischen Faktoren bzw. DNA bindenden Proteinen durchgeführt- der Binding-Site-Screen und der Yeast One Hybrid Screen.

Der Binding Site Screen nutzt die Spezifität der Bindung von cis-regulatorischen Proteinen an die transregulatorischen DNA-Sequenzen. Ein Protein, dass in der Lage ist an eine definierte DNA-Sequenz wie einen Enhancer zu binden, wird bei dieser Methode isoliert, indem eine Proteinexpressionsbank mit dem radioaktiv oder DIG markierten cis-regulatorischen DNA-Abschnitt durchmustert wird. Proteine, die in der Lage sind an das Fragment zu binden, können anschließend aufgrund der Markierung der gebundene DNA identifiziert werden

Der Binding Site Screen wurde durchgeführt mit den überlappenden DIG-PCR-Sonden ROPO1invers/ROPOH und ROPO1/RolsDex2 (amplifiziert mit Primern ROPO1invers und ROPOH, sowie den Primern ROPO1 und RolsDex2, s. Anhang). Zur Proteinexpression wurde die LDcDNA-Bank (aus dem Berkeley *Drosophila* Genome Project/EST-Project) verwendet. Der Screen führte zur Isolierung von einem auch im Rescreen positiven Klon. Nach der Isolierung der zugehörigen cDNA konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem enthaltenen Insert um die N-terminalen 1.5 kb des *eIF3-S10* -Gens handelt. Dieses codiert für eine Untereinheit des Translations-Initiationsfaktor 3.

Der parallel durchgeführte Yeast One Hybrid Screen (Methodik s. Material und Methoden) führte nicht zur Isolierung eines eindeutig an die eingesetzten DNA-Fragmente bindenden Proteins. Analysierte Klone enthielten meist nicht mit Nukleinsäure interagierende Proteine (z.B. Act57B). Ein Grund für die Isolierung zahlreicher falschpositiver Klone in diesem Screen könnte eine mangelnden Unterdrückung der hohen Histidin- Background- Expression durch das 3-AT sein.

4.4.2 Das Transkript von *eIF3-S10* ist während der Embryogenese in zahlreichen Zelltypen nachweisbar

Um zu überprüfen, ob der im Binding Site Screen identifizierte Faktor *eIF3-S10* eine Funktion in der Myogenese von *D. melanogaster* hat, wurde zunächst überprüft, ob dieser Faktor während der Myogenese mesodermal transkribiert wird. Hierzu wurde mit Hilfe der aus dem Binding Site Screen hervorgegangenen in Bluescript

befindlichen *eIF3-S10* cDNA eine RNA- Antisense Sonde hergestellt. Hierbei wurde zunächst der Bluescriptvektor (Bluescript SK) zunächst mit PstI geöffnet und anschließend eine *in vitro*- Transkription mit der T7 RNA-Polymerase durchgeführt. Das Transkript kann während der gesamten Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* nachgewiesen werden. Obwohl *eIF3-S10* anscheinend während der gesamten Embryonalentwicklung transkribiert wird, ist auffallend, dass bestimmte Gewebe erhöhte Transkriptmengen aufweisen. Hierzu gehören z.B. AMG und PMG (Abb. 4.4.2 A, weiße Pfeile), sowie das somatische und pharyngeale Mesoderm (jedoch nicht das viszerale Mesoderm) ab Stadium 10/11 (Abb. 4.4.2 A, blauer Pfeil) bis Stadium 14 (Abb. 4.4.2 B, C und D, blauer Pfeil) Andere Gewebe zeigen nur eine geringe bzw. keine Transkriptionsaktivität, so kann z.B. epidermal in späteren Stadien der Embryonalentwicklung kein Transkript nachgewiesen werden (Abb. 4.4.2 C und D, grauer Pfeil)

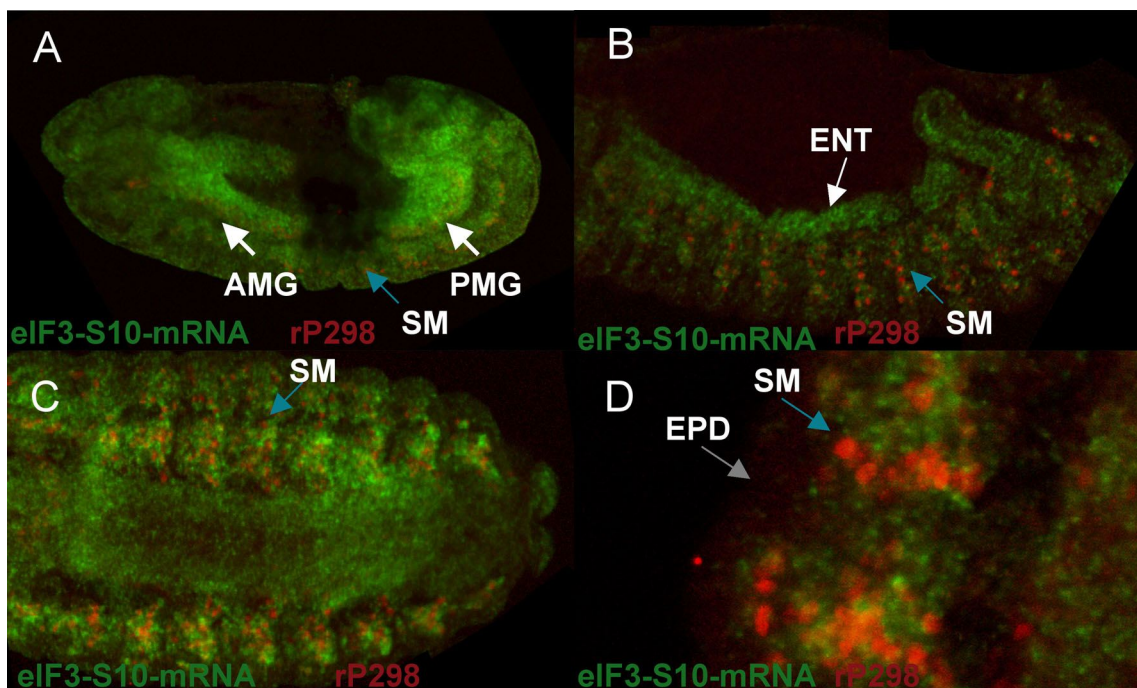


Abb. 4.4.2: Doppelmarkierungen von Embryonen der Stadien 12 (A), 13 (B) und 14 (C und D, Ausschnitt) mit einer anti-sense *eIF3-S10*-Sonde (grün) und rP298- lacZ (rot). Bereits in Stadium 12 kann das *eIF3-S10*-Transkript verstärkt im Entoderm (AMG und PMG bzw. ENT, weißer Pfeil) und im somatischen Mesoderm (SM, blauer Pfeil) nachgewiesen werden. Ab Stadium 13 ist epidermal (EPD, grauer Pfeil) kaum noch *eIF3-S10*-Transkript nachweisbar. Der Ausschnitt aus dem Mesoderm eines Embryos im Stadium 14 (D) zeigt, dass die Transkription von *eIF3-10* in den gleichen Zellen wie die Expression von rP298 erfolgt. Die Expression scheint sich dabei jedoch nicht auf die Founderzellen zu beschränken.

4.4.3 Das eIF3-S10 Protein wird während der gesamten Embryogenese von *D. melanogaster* exprimiert und kann in frühen Stadien an den Spindelpolen nachgewiesen werden

Zum Nachweis der eIF3-S10 Proteinverteilung wurde ein gegen das humane Homolog gerichteter polyklonaler Kaninchen- Antikörper verwendet (Shanina et al., 2001). Es zeigt sich, dass das Protein während der gesamten Embryogenese von *D. melanogaster* exprimiert wird und eine deutliche subzelluläre Lokalisation aufweist. Während der Mitosestadien ist das Protein an beiden Spindelpolen lokalisiert (Abb. 4.4.3 A) Außerhalb der Mitosen kann das Protein auch in der Nähe der Membran nachgewiesen werden, dies ist besonders gut anhand einer Population großer Zellen im Bereich des Mitteldarm erkennbar (Abb. 4.4.3 B).

Korrespondierenden zum Transkriptionniveau können im AMG und PMG (Abb. 4.4.3 C) sowie im somatischen Mesoderm (Abb. 4.4.3 C und D, roter Pfeil) erhöhte Proteinlevel dedektiert werden (Stadium 10/11-14). Die Epidermis ist in späten Entwicklungsstadien frei von Färbung.

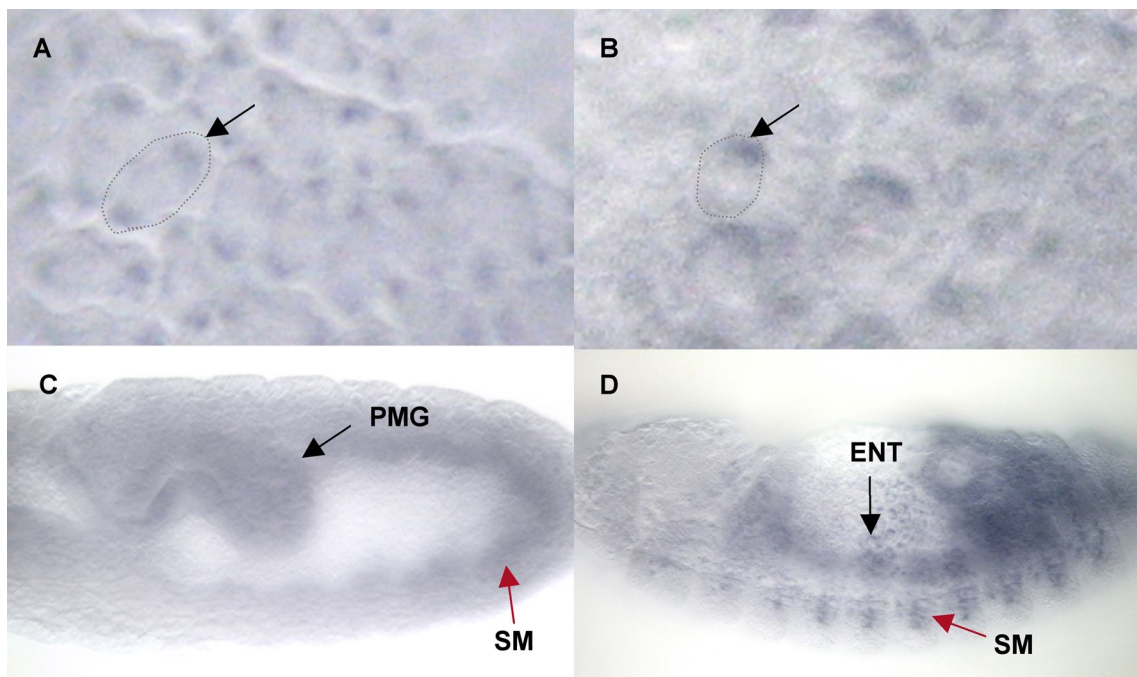


Abb. 4.4.3: Nachweis des von dem gegen die humane Form von eIF3-S10 gerichtet Antikörpers dedektierten Proteins. Der humane eIF3-S10 dedektiert ein Protein in den Spindelpolen der Blastodermzellen (A, schwarzer Pfeil) und in Stadium 11 und 13 (C und D) in Zellen des somatischen Mesoderms (SM, roter Pfeil) und des Entoderms (PMG bzw. ENT, schwarzer Pfeil). Dabei ist das Protein in den Zellen nicht gleichmäßig verteilt wie eine Ausschnittsvergrößerung von entodermalen Zellen in Bild B (schwarzer Pfeil) zeigt.

4.4.4 Homozygote Embryonen für eine P-Element-Integration im 1. Intron des *eIF3-S10* Gens sind embryonal letal, aber weisen keinen erkennbaren Muskelphänotyp auf

Um zu überprüfen, ob *eIF3-S10* bei der Regulation der *rols7*-Expression in der Myogenese von *D. melanogaster* benötigt wird, wurden homozygote Embryonen einer P-Element-Integration $P\{Epgy2\}eIF3-S10^{EY04238}$ analysiert und auf Störungen in der Muskelbildung untersucht. Die Integration des P-Elements in das 1. Intron des *eIF3-S10*-Gens führt zu embryonaler Letalität; dies wurde durch einen Letalitätstest überprüft, bei dem von 1000 Embryonen 527 nicht geschlüpft sind, was einer embryonalen Letalität von 52,7% entspricht. Berücksichtigt man, dass eine Letalität von 25% auf den TDLZ-Balancer der Linie zurückzuführen ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der P-Elementintegration in den *eIF3-S10*-Locus rezessiven Letalmarker handelt. Die Analyse der Muskelentwicklung bei mutanten Embryonen zeigt keine Störung in der Differenzierung der somatische Muskulatur (Abb. 4.4.4 B). Auch Epidermis und ZNS entwickeln sich wildtypisch. Im Bereich des Mitteldarms kommt es gelegentlich zum Dotteraustritt in das Mixocoel.

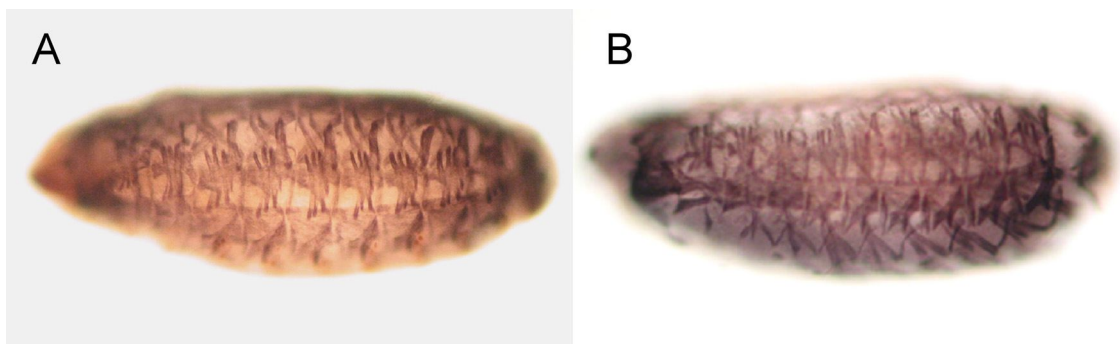


Abb. 4.4.4: β -Tubulin-Färbungen an Embryonen der Linie $P\{Epgy2\}eIF3-S10^{EY04238}$: Die Morphologie der Muskulatur mutanter Embryonen (B) weisen die gleiche Morphologie wie die wildtypische Muskulatur heterozygoter Balancertiere (A) auf.

4.4.5 Die *rols7* mRNA weist eine deutliche subzelluläre Lokalisation auf

Eine Regulation von *rols7* durch *eIF3-S10* auf Transkriptionsniveau erscheint aufgrund der vorhergesagten Funktion von *eIF3-S10* als Translationsinitiationsfaktor eher unwahrscheinlich. Da neben der translationsregulatorischen Funktion dieser Faktoren auch die Funktion von Translationsinitiationsfaktoren beim Transport der mRNA diskutiert wird (Strudwick and Borden, 2002) und bereits Hinweise auf eine

mögliche distinkte subzelluläre Lokalisation der *rols7* mRNA vorlagen (D. Buttgerit, persönliche Mitteilung) wurde die Lokalisation der *rols7* mRNA durch *in situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen *rols7*-Sonde analysiert. Es zeigt sich, dass sowohl im viszeralen als auch somatischen Mesoderm eine distinkte subzelluläre Lokalisation des Transkripts beobachtet werden kann. Dabei beschränkt sich die Lokalisation im somatischen Mesoderm z.B. im Stadium 12 auf 2-3 Spots pro Zelle (Abb. 4.4.5 A). In späteren Stadien ist relativ gut zu erkennen, dass sich diese Spots auf die Peripherie der Precursorzellen beschränken (Abb. 4.7.5 B). Auffallend ist auch es zwischen Transkription (ab Stadium 10) und dem Nachweis des Proteins (ab Stadium 11) einen zeitlichen Abstand gibt der für eine Translationsrepression der mRNA spricht.

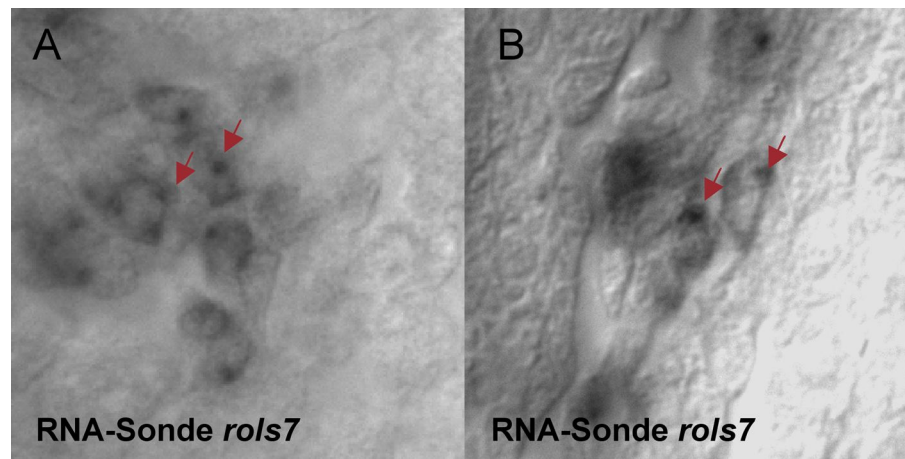


Abb. 4.4.5: *in situ*-Hybridisierungen mit einer *rols7* spezifischen Sonde: Embryonen der Stadien 11-12 (A) und 13 (B) zeigen subzelluläre Lokalisation der mRNA. Dabei beschränkt sich die Transkriptverteilung auf wenige Spots (rote Pfeile) an der Peripherie von Founder- und Precursorzellen.

4.5 Die Feststellung des Transkriptionsstarts von *rols7*

Die Ermittlung des Transkriptionsstarts (TSS) ist für die Charakterisierung eines Promotors essentiell, da die benachbarten Sequenzen den so genannten Core-Promotor bilden, an den die generelle Transkriptionsfaktoren binden. Zunächst ging man davon aus, dass der Core-Promotor unterschiedlicher Gene sehr ähnlich ist und nicht zur Spezifität der Genexpression beiträgt; mittlerweile wurde jedoch anhand zahlreicher Beispiele (s. Einleitung) beschrieben, dass auch der Core-Promotor an individuellen Regulationsvorgängen beteiligt ist.

Um den TSS des *rols*-Gens festzulegen wurde für beide *rols*-Transkripte eine Primer-Extension durchgeführt, bei der es nicht gelang den TSS von *rols7* zu ermitteln. Aufgrund von RT-PCR-Reaktionen, die mit unterschiedlichen 5' Primern durchgeführt wurden, erschien die Lokalisation des TSS in einem 50-60 bp-Fenster upstream der *rols7c*DNA wahrscheinlich. Innerhalb dieses Fensters findet sich ein putatives Initiator-Element mit der Basenabfolge TCAATT (s. Anhang). Dies entspricht zwar nicht dem optimalen Consensus für ein Initiator-Element bei *D. melanogaster*, kann aber trotzdem funktional sein, wie man anhand des Initiator mit dieser Basenabfolge bei dem Gen *engrailed* festgestellt hat (Soeller et al., 1988). Dieser putative Initiator könnte in Kombination mit einem DPE vorliegen, da sich 24 bp downstream des ersten A ein G befindet und in der Position -28 bis -32 relativ zum ersten A eine Sequenz deren Sequenz mit dem Consensus für ein DPE übereinstimmt (s. Anhang).

4.5.1 Die Eingrenzung des Transkriptionsstart mittels RT-PCR ergibt, dass das 1. *rols7*- Exon mind. 230 bp länger ist, als das 1. Exon der LD *rols7c*DNA

Um zu überprüfen, ob der putative Initiator + DPE für die Transkription von *rols7* benötigt wird, wurde versucht den TSS weiter einzugrenzen. Dazu wurden im Bereich des putativen Initiators die überlappenden Primer TRASTA1, TRASTA2 und TRASTA3 eingesetzt (s. Anhang). Als Gegenprimer diente zunächst der am Ende des 1. Exons lokalisierte 3' Primer ROPRIU. Als Template wurde mRNA eingesetzt, die aus Embryonen des Stadiums 10-13 des *delta*- Allels *DI^{B2}* eingesetzt. Mutante Embryonen dieser Linie bilden aufgrund eines Defekts des *Delta*-Gens mehr Muskelvorläuferzellen und enthalten somit ein höheres Level von *rols7*-mRNA.

Eine RT-PCR mit den oben beschriebenen Primern liefert für alle Ansätze ein PCR-Produkt in der zu erwartenden Größe (Abb 4.5.1, TRASTA1 Spur1). Um eine Kontamination durch genomische DNA auszuschließen, wurden Kontrollen mit den β 3-Tubulin-Primern β 3aa23 und β 3aa140 und den *rols* Primern LDI14 und LDI20 durchgeführt. Diese Primer sind jeweils in benachbarten Exons des *rols* bzw. des β 3-*Tubulin*-Gens lokalisiert und liefern mit genomischer DNA ein PCR-Produkt, dass in der Größe von dem RT-PCR Produkt abweicht. In der verwendeten mRNA konnte keine genomische DNA nachgewiesen werden (Abb. 4.5.3. Spur 6) RT-PCR Reaktionen mit den Primern ROPO1, ROPO2 und RMEFP als 5'-Primer und

ROPRIU als 3' Primer amplifizieren 340, 462 und 501 bp umfassende Produkte (Abb. 4.5.1 Spur 4, 5, 8 und 9 und s. Anhang). Mit der Primerkombination ROPOH und ROPRIU kann keine cDNA amplifiziert werden (Abb. 4.5.1 Spur 10). Ansätze mit einem 3'-Primer, (Rols7.2.1) der am Beginn des 2. Exons abgeleitet wurde, und den 5' Primern TRASTA1, ROPO1 und RMEFP amplifizierten cDNAs in den zu erwartenden Größen (s. Anhang). Die Sequenzierung einer mit den Primern RMEFP und Rols7.2.1 amplifizierten Fragments zeigt, dass es sich um eine cDNA handelt, bei der sich das zweite Exon direkt an das erste Exon anschließt und die mit der Sequenz des RMEFP Primers endet. Die Länge des 1. Exon dieser cDNA übersteigt die Länge des 1. Exons der LD *rols7*cDNA um mind. 230 bp.

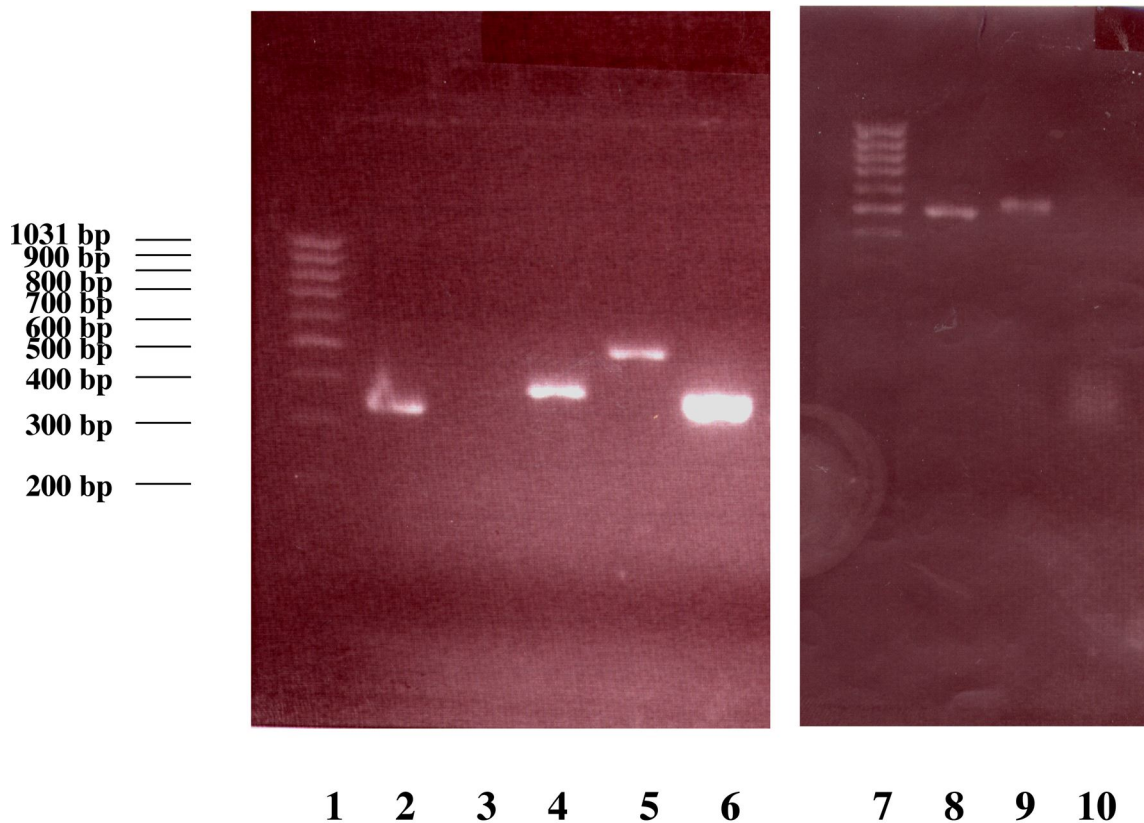


Abb. 4.5.1: RT-PCR Ansätze zur Festlegung des Transkriptionsstart von *rols7*. Spur 1 und 7: DNA Leiter „Low Range“, Spur 2-5 und Spur 9-10 RT-PCR-Ansätze mit ROPRIU als 5'-Primer und TRASTA1 (Spur 2), TRASTA1 + RNase (Spur 3, Kontrollreaktion) ROPO1 (Spur 4), ROPO2 (Spur 5 und 8), RMEFP (Spur 9) und ROPOH (Spur 10) als Gegenprimer. In Spur 6 ist die β 3-Tubulin-Kontrolle aufgetragen, hier kann nur die für das RNA- Template typische Bande ohne Intron identifiziert werden.

4.5.2 Die *in silico* Feststellung eines putativen *rols7*-Transkriptionsstart mit dem Programm Markov Chain Promotor Finder „McPromoter“ MM:II

Bei McPromoter handelt es sich um ein Programm, das in der Lage ist eukaryotische Polymerase II abhängige Transkriptionsstarts innerhalb von bis zu 20 kb großen DNA-Sequenzen zu erkennen.

Die Analyse eines 1740 bp umfassenden Abschnitts aus der *rols7*- Promotorregion (endet 3' mit den ersten 105 bp der LD *rols7* cDNA) ergibt eine Vorhersage für den TSS in der Position 1377 oder 1378 der verwendeten 1740 bp; es handelt sich hierbei um ein A bzw. um ein C (s. Anhang). Für die Analyse wurde ein „cut off Value“ von 0.8 gewählt.

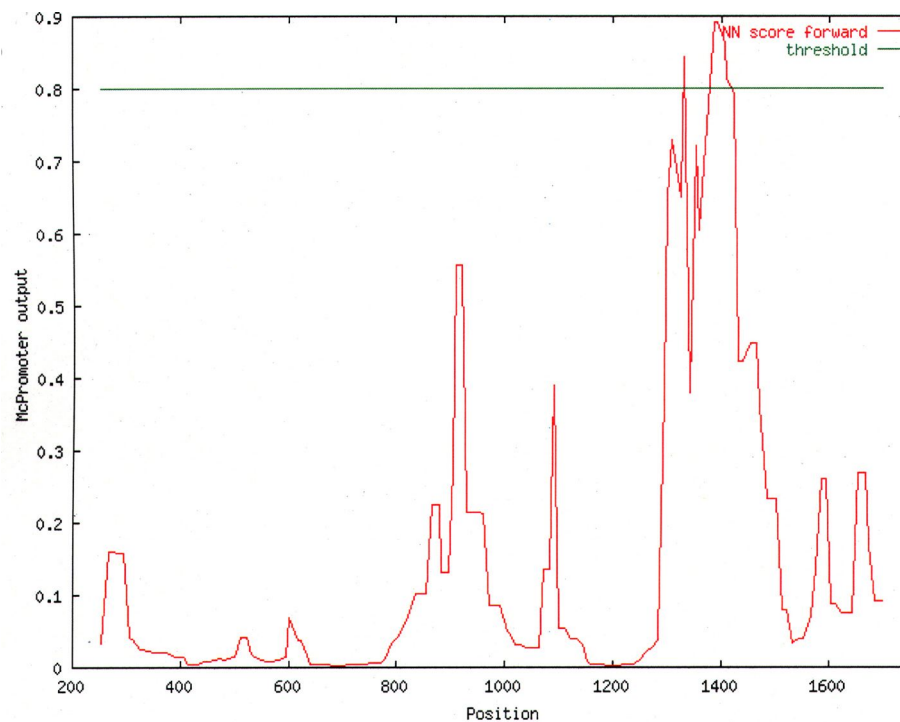


Abb. 4.5.2 graphische Darstellung der Vorhersage des TSS durch McPromoter.

4.5.3 Die Festlegung des Transkriptionsstarts von *rols7* durch Primer-Extension

Bei der Primer-Extension wird der Transkriptionsstart lokalisiert, indem man mit einem 3' Primer eine reverse Transkription vornimmt und anschließend die Länge der cDNA bestimmt. Limitierend ist hier oft die mRNA-Menge, da keine Amplifikation der cDNA stattfindet. Um eine bessere Ausbeute von *rols7*- mRNA zu erreichen,

wurde die mRNA aus Embryonen des *delta* Allels $D\beta^2$ (welche aufgrund der erhöhten Anzahl an Founderzellen vermehrt *rols7* transkribieren) extrahiert (s. Punkt 4.4.1). Zunächst wurde für die Primer-Extension der Primer ROPRIUI IR700 verwendet; mit diesem Primer konnte jedoch kein Transkriptionsstart ermittelt werden. Aufgrund der Ergebnisse aus der RT-PCR Analyse und der Vorhersage von McPromoter wurde der weiter 5' lokalisierte Primer ROPO1InIR700 eingesetzt. Dieser Primer produziert eine cDNA definierte Länge, die als einzelnes starkes Signal auf dem Sequenzgel erkennbar ist (Abb 4.5.3, Spur 6). Die Länge der cDNA korreliert auf Sequenzebene mit einem G (Antisense-Strang) bzw. mit einem C (Sense-Strang). Dieses C (s. Anhang) stimmt mit dem durch McPromotor vorhergesagten TSS überein (das C in der Position 1378 des 1740 bp Abschnitts).



Abb. 4.5.3: Sequenziergel für die Auswertung der Primerextension. In den Spuren 1-4 sind die Sequenzierreaktionen mit dem IR markierten Primer ROPO1InIR700 für Adenin (1), Cytosin (2), Guanin (3) und Thymin (4). Die aus der Primerextension hervorgegangene cDNA wurde in Spur 6 aufgetragen.

4.6 Die phänotypische Analyse von mutanten Embryonen mesodermal exprimierter Transkriptionsfaktoren

Bei der phänotypischen Analyse von für mesodermal exprimierte Gene mutante Embryonen handelt es sich um einen weiteren Ansatz zur Identifikation von *rols7* regulierenden Transkriptionsfaktoren. Ist ein Faktor direkt oder indirekt in die Transkriptioninitiation involviert, sollten Mutanten dieser Embryonen eine Fehlregulation von *rols7* zeigen, d.h. das sie entweder eine verringerte oder nicht vorhandene *rols7*- Expression aufweisen oder eine vermehrte Expression. Ist ein aktivierender Transkriptionsregulator mutiert ist ein der *rols*-Mutante ähnlicher Phänotyp zu erwarten.

4.6.1 Mutationen der ETS-Transkriptionsfaktoren *pointed* und *yan* haben keinen Einfluss auf die Transkription von *rols7*

Das Gen *pointed* codiert für einen ETS-Transkriptionsfaktor dessen Transkript P2 spezifisch mesodermal transkribiert wird. Er ist ein Ziel des MAP-Kinase Pathways und ist zumindest an der Determination einzelner Muskelgründerzellen beteiligt (Halfon et al., 2000)).

Vier aus einer EMS Mutagenese hervorgegangene Allele des Gens *pointed* zeigen bei der phänotypischen Analyse Störungen in der Myoblastenfusion. Der Phänotyp des stärksten Allels (*pnt*^{3D2-26}) ähnelt auffallend dem Phänotyp der *rols7*-Mutante (Abb. 4.6.1 A) Neben zahlreichen unfusionierten Myoblasten sind kleine Muskelfasern zu beobachten, die größtenteils mehrkernig erscheinen. Die phänotypische Analyse der Muskulatur bei den *pointed* –Null-Allele $\Delta 88$ (Abb. 4.6.1 D) und *pnt*² (Daten nicht gezeigt) zeigen jedoch keinen Fusionsphänotyp. Bei Embryonen beider Linien ist zu beobachten, dass das Muskelmuster gestört ist und einige Muskeln fehlen. Transheterozygote $\Delta 88$ und *pnt*^{3D2-26} –Embryonen haben nur einen schwach ausgeprägten Fusionsdefekt aber es fehlt ähnlich wie bei $\Delta 88$ homozygoten Embryonen ein Teil der Muskulatur (Abb. 4.6.1 C)

In situ-Hybridisierungen mit einer *rols*-Sonde aus dem 3'-Bereich können keine Fehlexpression von *rols* bei Embryonen der Linie *pnt*² zeigen. Auch Embryonen des Allels *pnt*^{3D2-26} selbst scheint Rols korrekt zu exprimieren (Abb. 4.6.1 B und Daten nicht gezeigt). Parallel zu den Auswirkungen der Mutation von *pointed* auf die

Transkription von *rols* wurde auch die Auswirkung von Mutationen in dem *pointed*-Antagonisten *yan* analysiert. Bei mutanten Embryonen des *yan*- Allels *aop*¹ (Null-Allel) können keine Hinweise auf einen Fusionsphänotyp identifiziert werden, es scheinen z.T. zu viele Muskeln vorhanden zu sein (Abb. 4.6.1 E).

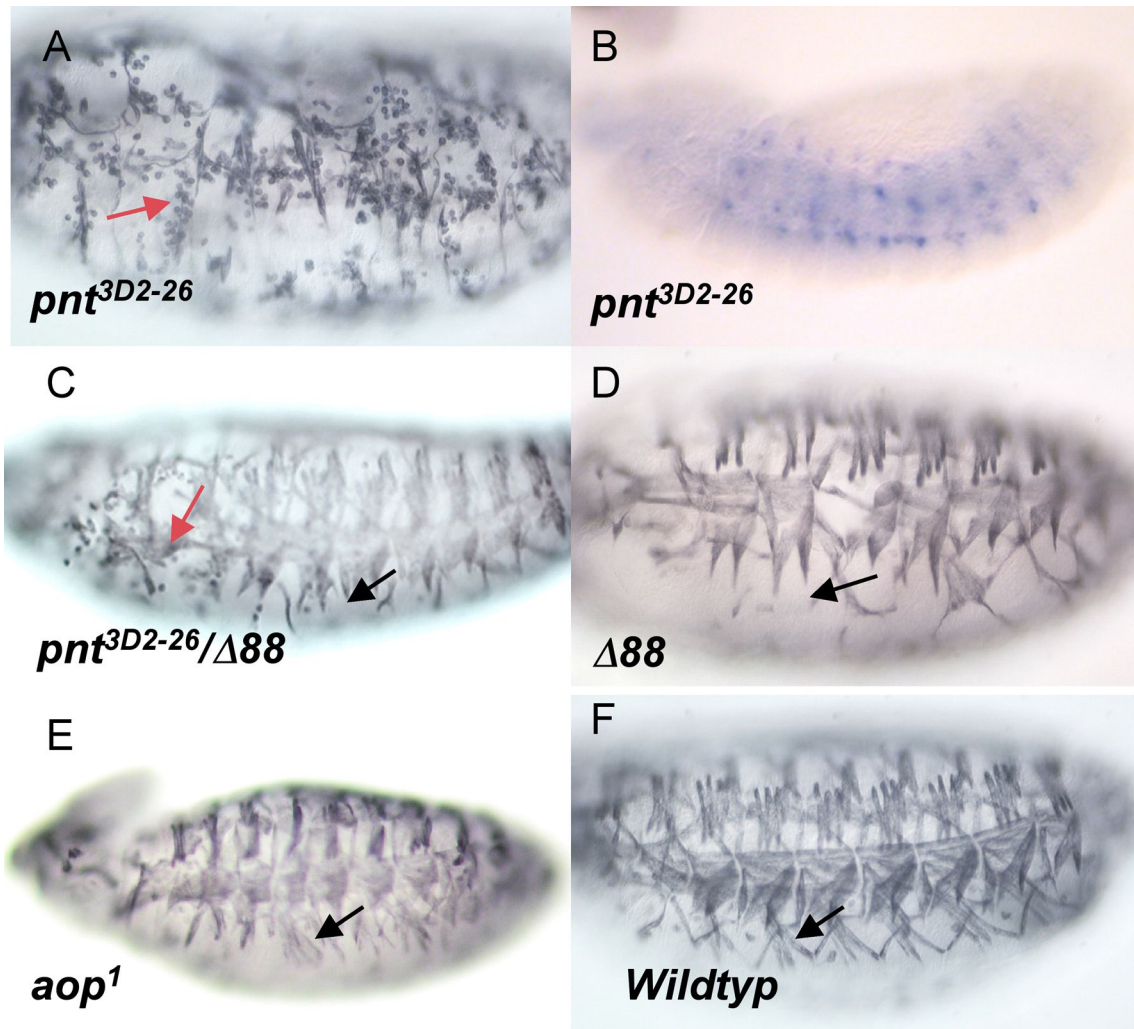


Abb. 4.6.1: Der Muskelphänotyp verschiedener *pointed*-Allele im Vergleich zum Wildtyp: Homozygot mutante Embryonen des Allels *pnt*^{3D2-26} weisen einen starken Fusionsdefekt mit zahlreichen unfusionierten Myoblasten (roter Pfeil) auf (A) aber transkribieren immer noch *rols7* (B, *rols7* spezifische RNA-Sonde, Stadium 13). Bei transheterozygoten *pnt*^{3D2-26}/Δ88 Embryonen fehlt ein Teil der Muskeln (C, schwarzer Pfeil) aber sie zeigen nur einen leichten Fusionsdefekt mit wenigen unfusionierten Myoblasten (C, roter Pfeil). Bei homozygoten Δ88-Embryonen sind nur selten unfusionierte Myoblasten zu beobachten, es werden jedoch zu wenige Muskeln gebildet (D, in der durch den Pfeil markierten Position sollte eine Gruppe aus drei ventralen Muskeln lokalisiert sein, die jedoch vollständig fehlen). Bei *yan*-mutanten Embryonen (Allel *aop*¹ können ebenfalls keine unfusionierten Myoblasten nachgewiesen werden, es kommt jedoch zur Verdoppelung von Muskeln (E, die durch die Pfeil markierte Gruppe ventraler Muskeln besteht aus mind. vier Muskeln, wildtypisch sind in dieser Position drei Muskeln F, Pfeil). F: Wildtypembryo

4.6.2 *Dmef2* mutante Embryonen zeigen keine durch die *rols7*-Promotorkonstrukte gesteuert Reportergenexpression im Dorsalgefäß

Bei dem Transkriptionsfaktor *Dmef2* handelt es sich um einen MADS-Box-Transkriptionsfaktoren der in der Myogenese von *D. melanogaster* eine wichtige Rolle spielt. Mutationen in diesem Gen führen zu einer ausgeprägten Fusionsstörung. Auch weitere mesodermale Gewebe sind von Defekten betroffen, dass Dorsalgefäß entwickelt sich jedoch morphologisch normal, obwohl *Dmef2* in diesem Gewebe exprimiert wird. Nach dem Einkreuzen des Reporterkonstrukts RPL in das amorphe *dmef2*-Allel *mef*²²⁻²¹ kann die sonst bei diesem Konstrukt beobachtete Reportergenexpression im Dorsalgefäß nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.6.2. B). Die Reportergenexpression in der somatischen Muskulatur ist nicht betroffen; dies korreliert mit der von Chia et al. 2001 gemachten Beobachtung, dass die *rols7*-Expression in *dmef*-Mutanten Embryonen nicht beeinträchtigt ist.

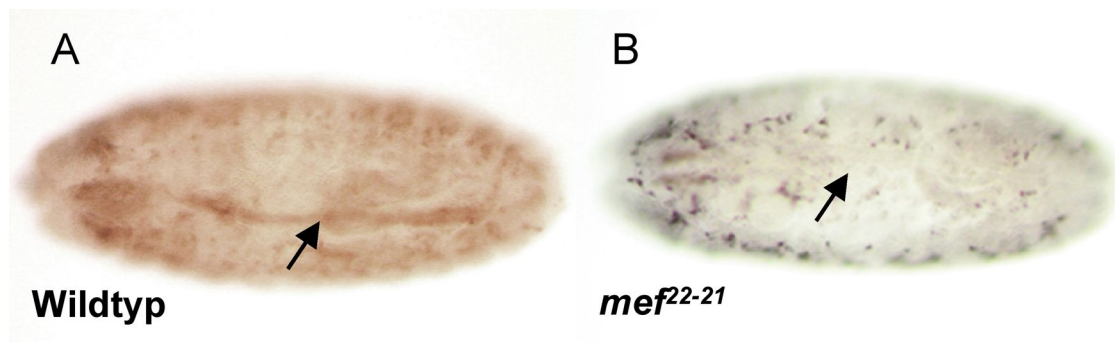


Abb 4.6.2: Die Expression des RPL- Konstrukts in Wildtyp-Embryonen (A) und in *dmef2*-mutanten Embryonen (B) des Stadiums 16. Die Pfeile weisen auf das Dorsalgefäß

4.6.3 Die Expression von *Rols7* ist unabhängig von den Zinkfingertranskriptionsfaktoren *Lameduck* und *Jing*

Zahlreiche Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Zu dieser Familie gehören auch die mesodermal transkribierten Gene *lameduck* und *jing*. Die Myoblastenfusion ist in *lameduck*-Mutanten gestört und es wurde gezeigt, daß in diesen Mutanten die Gene *mef2* und *sns* in den fusionskompetenten Myoblasten nicht exprimiert werden (Duan et al., 2001). Für *jing* wurde bisher kein mutanter Phänotyp beschrieben. Wird auf *lameduck*- mutanten Embryonen (*lameduck*²) eine Antikörperfärbung mit *Rols7*-

spezifischen Antikörpern durchgeführt kann Rols7 in den Muskelvorläufern nachgewiesen werden (Abb.4.6.3 D).

Die phänotypische Analyse mutanter Embryonen einer mit Gen *jing* assoziierten P-Element-Insertion (Allel P{PZ}*jing*⁰¹⁰⁹⁴) liefert keinen Hinweis darauf, dass *jing* an der Myoblastenfusion beteiligt ist (Abb.4.6.3 B)

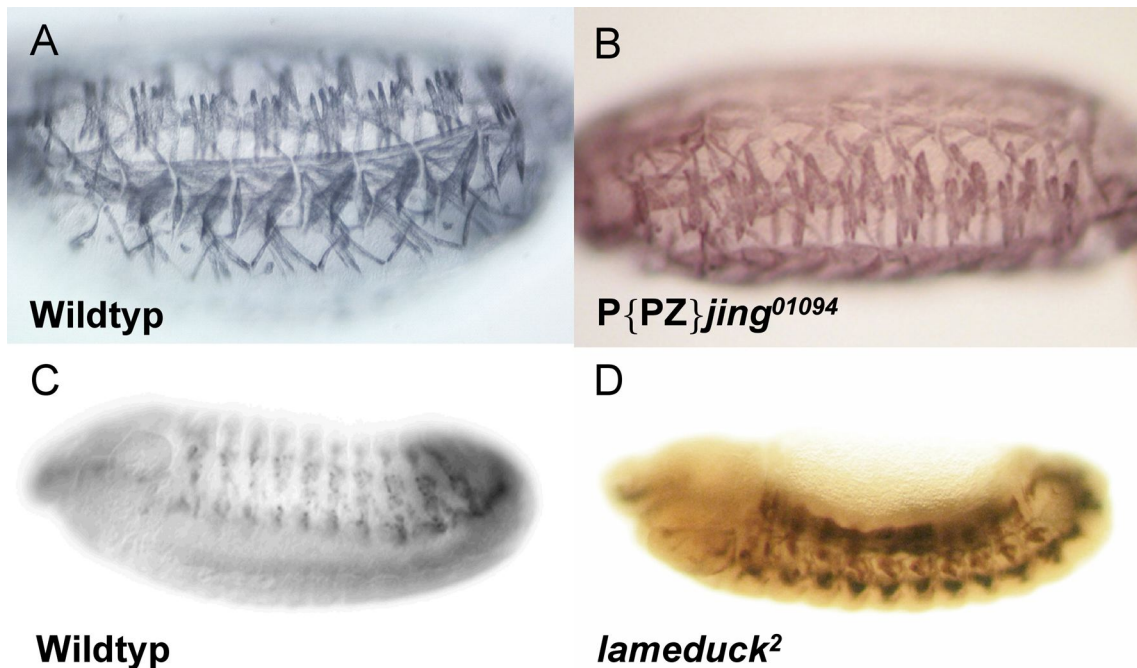


Abb. 4.7.3: Phänotypische Analyse der Allele P{PZ}*jing*⁰¹⁰⁹⁴ und *lameduck*²: β3-Tubulin-Antikörperfärbungen an Wildtyp- (A) und einem *jing*-mutanten (B) Embryonen des Stadium 16. anti-Rols7 Antikörperfärbungen an Wildtyp- (C) und *lameduck*-mutanten (D) Embryonen des Stadium 13

4.6.4 Die phänotypische Analyse von Genen die laut BDGP *in situ* im somatischen Mesoderm exprimiert werden

Da die Analyse bisher bekannter fusionsrelevanter Transkriptionsfaktoren keinen Hinweis auf einen Aktivator oder Repressor der *rols7*-Transkription ergab, wurde die *in situ*-Datenbank des BDGP nach Genen durchsucht mit einem Expressionsmuster, welches mit der Rols-Expression korreliert. Es wurde einige Gene identifiziert, die ein solches Expressionsmuster aufweisen und für putative Transkriptionsfaktoren codieren bzw. Gene deren Funktion bisher unbekannt ist. Bei diesen Genen handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren: CG10462, CG3850 und CG7839; die generellen Transkriptionsfaktoren: Bicaudal und Rpb5 und um die Faktoren unbekannter Funktion: CG12785; CG3371 und CG 14122.

Um zu überprüfen ob diese Gene regulationsrelevant für *rols7* sind, wurden folgende Defizienzen, welche die jeweiligen Gene deletieren phänotypisch analysiert:

| Defizienz | Gen mit mesodermalem Expressionsmuster |
|---------------|---|
| Df(2L9pr-A16) | CG10462; Transkriptionsfaktor |
| Df(2R)CX-1 | CG3850 (sugarbabe), Transkriptionsfaktor und CG3644 (bicaudal), genereller Transkriptionsfaktor |
| Df(2R)stan1 | CG11979 (Rpb5) RNA-Polymerasell-Untereinheit |
| Df(3L)ED4457 | CG7839, Transkriptionsfaktor |
| Df(3R)P115 | CG12785, Funktion unbekannt und CG10388 (Ultrabithorax), Transkriptionsfaktor |
| Df(3L)emc-E12 | CG3371, Funktion unbekannt |
| Df(3L)eyg[C1] | CG1422, Funktion unbekannt |

Bei keiner der untersuchten Defizienzen konnte in einer β 3-Tubulinfärbung ein *rols*-ähnlicher Fusionsphänotyp beobachtet werden und die Transkription von *rols7* konnte bei allen Defizienzen durch *in situ*-Hybridisierungen im somatischen Mesoderm nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei homozygoten Embryonen der Defizienz Df(2R)stan1 kann das *rols7*-Transkript nicht mehr im viszeralem Mesoderm detektiert werden (Abb.4.6.4 B) Diese Embryonen weisen insgesamt schwere Entwicklungsstörungen auf und ziehen den Keimstreif nicht zurück. Mit Hilfe einer FascilinIII-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die fehlende viszerale Expression von *rols7* nicht auf ein Fehlen des viszeralem Mesoderm zurückzuführen ist. Dieses wird in mutanten Embryonen korrekt mit FCMs und Founderzellen angelegt (Abb. 4.6.4 D).

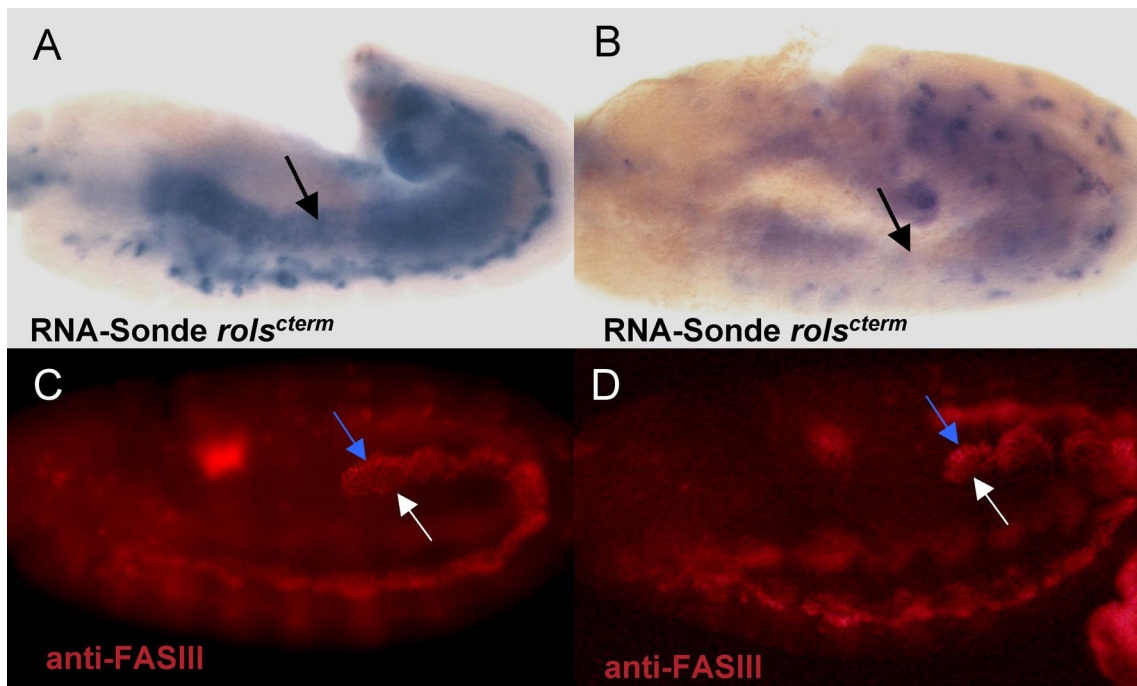


Abb. 4.6.4: Homozygote Embryonen der Defizienz In homozygote Embryonen Df(2R)stan1 zeigen trotz normal angelegtem viszeralem Mesoderm keine *rols7* Transkription in diesem Gewebe: Bei Embryonen der Defizienz Df(2R)stan1 (B, Stadium 12) kann im Vergleich zum Wildtyp (A, Stadium 12) kein *rols* Transkript im Bereich des viszeralem Mesoderms mehr nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Die Analyse der FASIII-Proteinverteilung in Wildtypembryonen (C) und homozygot mutanten Embryonen (D) im Stadium 11 zeigt, dass das viszerale Mesoderm mit Foundern (blauer Pfeil) und FCMs (weißer Pfeil) in den Mutanten normal angelegt wird

4.7 Die subzelluläre Lokalisation von fusionsrelevanten Proteinen und die Auswirkung von Mutationen in fusionsrelevanten Genen auf diese Lokalisation

Für die Myogenese von *D. melanogaster* ist die korrekte Expression des *rols7* Gens von immenser Bedeutung, da das Fehlen des Genprodukts zu einem schweren Myoblastenfusionsdefekt führt. Bis heute ist jedoch nicht klar, welche Funktion das Rols7-Protein in diesem Prozess hat. Bekannt ist, dass das Protein nur in den Founder- und Precursorzellen lokalisiert ist und dort über Duf/Kirre mit der Plasmamembran assoziiert ist. Durch diese Assoziation ist Rols7 möglicherweise in Prozesse involviert, die mit der über Duf/Kirre und Sns erfolgenden Zellerkennung und Zelladhäsion von FCMs und Founder/Precursorzelle gekoppelt sind und über weitere Komponenten der Fusionsmaschinerie zur Fusion der Plasmamembranen der beiden Zelltypen führt. Um die Funktion von Rols7 für den Prozess der Myoblastenfusion besser einordnen zu können, wurde aus diesem Grund die subzelluläre Lokalisation des Rols7-Proteins im Vergleich zur Lokalisation von

Duf/Kirre und Sns in Wildtypembryonen und in verschiedenen bekannten Fusionmutanten (z.B. *blow* und *kette*) analysiert

4.7.1 Die fusionsrelevanten Proteine Rols7, Duf/Kirre und SNS weisen eine übereinstimmende Membranlokalisation auf, bei der die Proteine in einer ringförmigen Struktur angeordnet sind

Der Nachweis des Rols7-Proteins mittels Antikörpern zeigt, dass es sich bei dem Protein um ein cytoplasmatisches Protein handelt, dass mit der Membran assoziiert ist (Menon und Chia, 2001; Olson et al., 2001). Analysiert man die Lokalisation des Proteins genauer ist zu beobachten, dass beginnend mit der Myoblastenfusion das Protein hauptsächlich an den Kontaktstellen von FCMs und Founderzellen mit der Membran assoziiert ist (Abb. 4.7.1a B und E). Dies wird besonders in späteren Stadien der Fusion deutlich, wenn nur noch wenige FCMs mit den inzwischen fast vollständig ausgebildeten Muskelfasern fusionieren und das Protein auf die Kontaktstelle von Filopodium und Muskel beschränkt ist (Abb. 4.7.1a E). Die Verteilung des Proteins ist in diesem Bereich nicht gleichmäßig, sondern bildet eine ringförmige Struktur aus, die in der Größe mit der Kontaktstelle des Filopodiums des FCMs an den Muskel übereinstimmt (Abb. 4.7.1a E). Das Zentrum ist frei von Protein. Im Falle des Duf/Kirre- (Abb. 4.7.1a A, D, G und H) und des SNS-Proteins (Abb. 4.7.1a C und F) konnte ebenfalls eine ringförmige Proteinanordnung an den Kontaktstellen von FCM mit Founder- bzw. Precursorzelle beobachtet werden (Abb. 4.7.1a). Auch im Bereich der Pharynx- und der viszerale Muskulatur können die Proteine in ringförmigen Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 4.7.1a G und H).

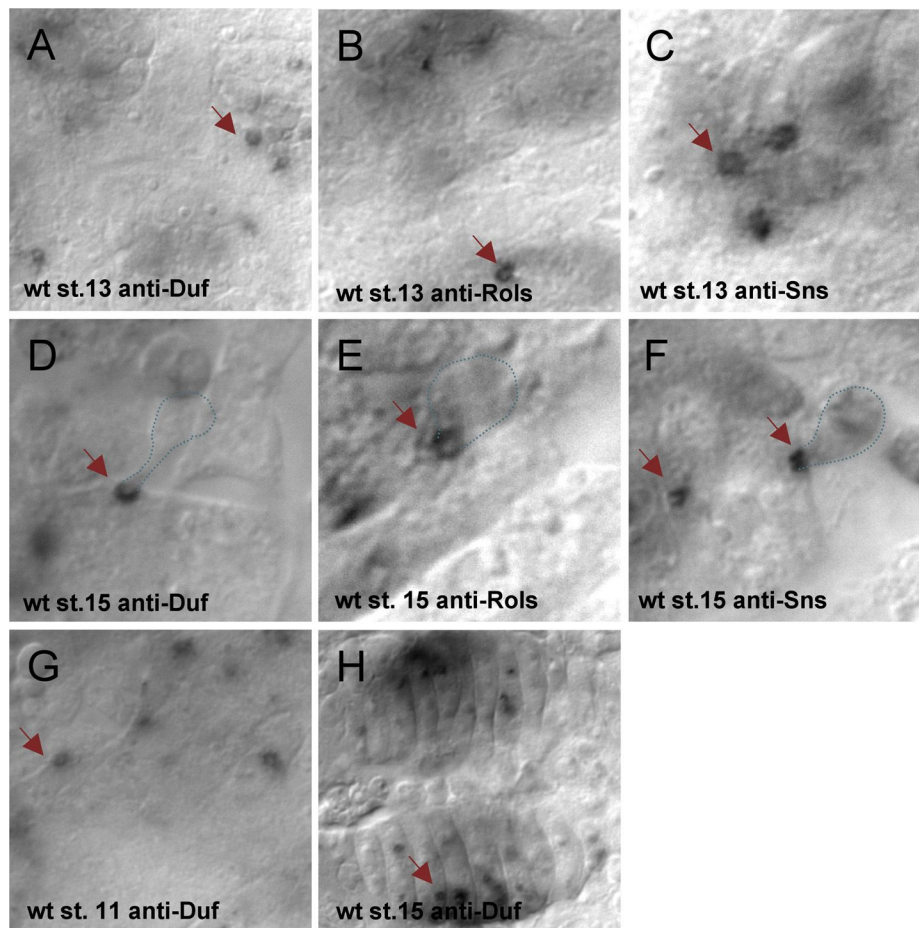


Abb. 4.7.1a: Nachweis der ringförmigen Proteinverteilung von Duf (A, D, G und H), Rols7 (B und E) und Sns (C und F) in den Zellen der somatischen Muskulatur (A-F), der viszeralen Muskulatur (G) und der Pharynx-Muskulatur (H) an Wildtypembryonen. Die ringförmige Proteinexpression beschränkt sich hierbei auf die Kontaktstellen von Myoblasten (grau gestrichelt) und Precursorzellen (D-F)

Die initiale Größe der Struktur scheint ca. 1µm zu betragen und kann in dieser Größe beim Kontakt des Filopodiums mit der Founder und Precursorzelle häufig beobachtet werden (s. Abb. 4.7.1a; D und 4.7.1b; A). Seltener können ringförmige Strukturen mit größerem Radius nachgewiesen werden, bei denen die fusionierende Myoblaste dichter an die Founder- und Precursorzellen angelagert ist (Abb. 4.7.1b, A+B). Die maximal nachweisbare Größe der Struktur beträgt ca. 4-5 µm und die fusionierend Myoblaste steht in sehr engem Kontakt mit der Founder bzw. Precursorzelle (Abb. 4.7.1b, D).

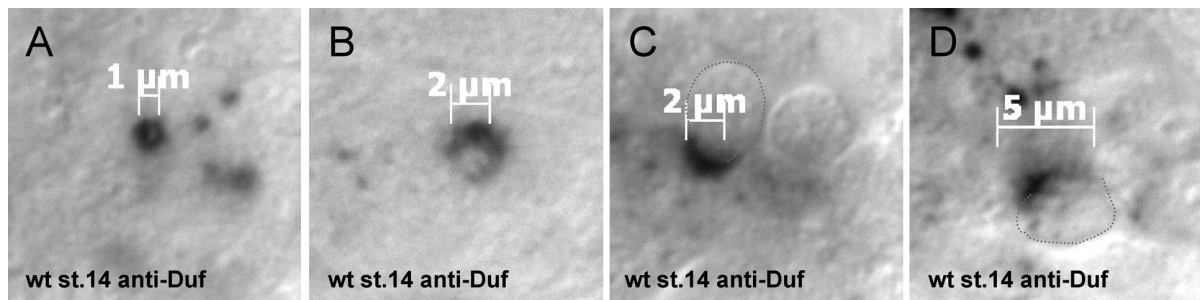


Abb. 4.7.1b: Die ringförmige Struktur dehnt sich radial aus: Die ringförmige Struktur hat zunächst einen Durchmesser von ca. 1 µm und dehnt sich im Zuge der Fusion radial aus und kann eine Größe von nahezu 5 µm (D) erreichen. Die dicht an der Precursorzelle anliegende Myoblaste kann Bild C und D deutlich identifiziert werden (grau umrandet).

In Stadien vor der dem Einsetzen der Fusion ist zu beobachten, dass das Rols7 Protein zwar schon ab Stadium 10/11 in den Vorläufern der viszeralen und etwas später in der somatischen Muskulatur vorhanden ist, jedoch im Stadium 11 bzw. 12 keine ausgeprägte subzelluläre Lokalisation aufweist (Daten nicht gezeigt).

4.7.2 F-Actin kolokalisiert mit Rols7 und Titin an der Kontaktstelle von FCM und Precursorzelle, jedoch nicht mit β_{PS} -Integrin

Die Bildung einer ringförmigen Struktur im Bereich einer adhesiven Struktur entspricht der typischen Proteinanordnung in einem Podosom oder einer immunologischen Synapse. Bei der immunologischen Synapse kann ein adhäsiver Ring von Proteinen der Integrinfamilie beobachtet werden, die um einen Kern aus anderen Proteinen wie z.B. T-Cell-Rezeptoren gruppiert sind. Bei Podosomen handelt es sich um 0,5- 2µm große Proteinkomplexe die aus einem Kern von F-Actin und F-Aktin interagierenden Proteinen und einem Ring von adhesiven Proteinen der Integrin-Familie bestehen. Neben diesen Komponenten sind zahlreiche weitere Proteine mit Funktionen im Aktin-Cytoskelett Rearrangement am Aufbau von Podosomen beteiligt (Review Linder and Kopp, 2005). Da im Vertebratensystem Podosomen als adhesive Strukturen in Muskelzellen nachgewiesen werden konnten (Hirayama et al, 2000), wurde durch Doppelfärbungen von F-Actin mit Rols7, Titin (dessen Lokalisation von Rols7 abhängig ist, Menon and Chia, 2001) und dem *Drosophila* $\beta 1$ -Integrin Homolog β_{PS} -Integrin überprüft ob diese Proteine mit F-Actin kolokalisieren und eine Unterteilung in F-Aktin-Kern mit aktininteragierenden Proteinen wie Titin (interagiert z.B. im I-Band des Sarkomers mit Aktin) und Ring aus Adhäsionvermittelnden Proteinen nachgewiesen werden kann.

Dazu wurden Embryonen der Stadien 13-15 zunächst handdevittelinisiert und in diesen Embryonen F-Aktin mit TRITC gekoppelten Phalloidin nachgewiesen. Im Anschluss erfolgte die Proteindetektion von Rols7, Titin und β_{PS} -Integrin mit den jeweiligen Antikörpern.

F-Aktin kann im Stadium 13 in einem punktuellen Muster im Mesoderm beobachtet werden, welches mit dem Rols7-Expressionsmuster fast vollständig übereinstimmt (Abb. 4.7.2 A-C). Bei höherer Vergrößerung zeigt sich, dass die F-Aktin und Rols7-Expressionsdomäne nur teilweise überlappen. Im Gegensatz zu der ringförmigen Lokalisation von Rols7 (Abb. 4.7.2 H und L) weist das F-Aktin eine flächige Lokalisation auf (Abb. 4.7.2 I und M). Dabei scheint das F-Aktin zu großen Teilen innerhalb des proteinfreien Teils des Rols7-Ringes lokalisiert. Eine wirkliche Überlappung der Expressionsdomänen ist nur im Übergangsbereich vom Ring zum Kern nachweisbar (Abb. 4.7.2 J und N). Betrachtet man eine solche Struktur von der Seite ist der Ring als Bereich der Kolo-kalisation von Rols7 und F-Aktin identifizierbar; auf Seiten der FCM-Zelle kann weiteres F-Aktin im Filopodium beobachtet werden (Abb. 4.7.2 D-F).

Auch F-Aktin und Titin kolo-kalisieren im Bereich der Kontaktstellen von FCM und Precursorzellen. Im Gegensatz zu Rols7 weist Titin jedoch keine ringförmige Anordnung auf und kolo-kalisiert vollständig mit F-Aktin (Abb. 4.7.2 O und P). Die Vergrößerung der Kontaktstelle führt gleichzeitig zu einer Vergrößerung der Kolo-kalisationsdomäne (Abb. 4.7.2 Q, Pfeil). Eine weitere Überlappung der Titin und F-Aktin-Expressionsdomäne kann in Embryonen des Stadium 15 zusätzlich an den Anheftungsstelle der Muskulatur an der Epidermis nachgewiesen werden (Abb. 4.7.2 O). Im Gegensatz dazu kann im Fall von β_{PS} -Integrin keine Kolo-kalisation des Proteins mit F-Aktin im Bereich der Kontaktstelle von FCM und Precursor nachgewiesen werden (Abb. 4.7.2 R). Die Expression von β_{PS} -Integrin im somatischen Mesoderm beschränkt sich auf die Muskelanheftungsstellen, in diesen Bereichen kolo-kalisiert F-Aktin mit β_{PS} -Integrin (Abb. 4.7.2 R).

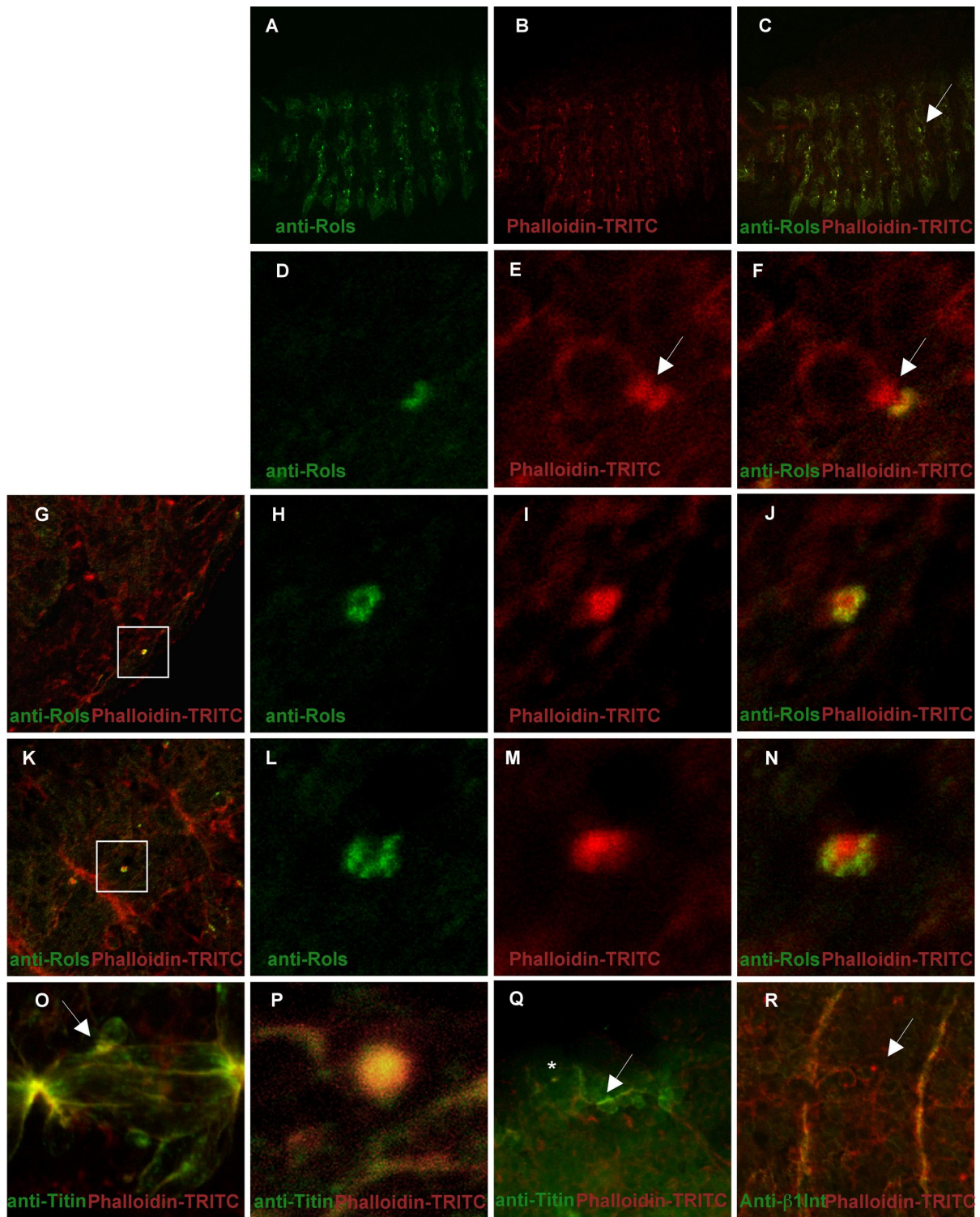


Abb. 4.7..2 Doppelmarkierungen von Wildtyp-Embryonen der Stadien 13 (A-C), 15 (D-P) und 14 (Q-R) mit jeweils Phalloidin-TRITC zum Nachweis von F-Aktin und anti-Rols (A-K), anti-Titin (O-Q) und anti- β_{PS} -Integrin (R). Die Bilder A-C zeigen hierbei die Kolokalisation von Rols mit F-Aktin mit einer punktförmigen Verteilung (weißer Pfeil) im somatischen Mesoderm. Auf den Bildern D-F kann deutlich die Kolokalisation von F-Aktin und Rols im Bereich der Kontaktstellen von Myoblasten mit der Precursorzelle beobachtet werden (Pfeil), dabei hat F-Aktin im Bereich der FCM eine etwas breitere Expressionsdomäne und kann noch im Filopodium nachgewiesen werden. Die Bilder G-N zeigen anhand zweier Ausschnittsvergrößerungen (weißer Kasten G und K), dass F-Aktin und Rols nur teilweise kolokalisieren, wobei Rols eine Ringstruktur bildet und F-Aktin verstärkt im Kern des Ringes nachgewiesen werden kann (H-J bzw. L-N). Auf den Bildern O-Q ist die Kolokalisation von F-Aktin mit

Titin dargestellt. Die Expressionsdomäne von F-Aktin mit Titin überlappt vollständig (P). Sowohl auf Bild O und Bild Q wird deutlich, dass neben der Kolokalisation von F-Aktin und Titin im Bereich der Muskelanheftungsstellen eine Kolokalisation von F-Aktin und Titin an der Kontaktstelle von FCM zur Precursorzelle stattfindet (O, Pfeil; Q, Pfeil und Stern). Im Zuge der Fusion vergrößert sich mit dem Kontakt gleichzeitig der Bereich der Kolokalisation, was anhand der Abbildung Q nachvollzogen werden kann (initialer Kontakt: Stern, verbreiteter Kontakt: Pfeil). β_{PS} -Integrin kolokalisiert nur an den Muskelanheftungsstellen mit F-Aktin, die punktförmige Proteinverteilung an den Kontaktstellen beschränkt sich auf F-Aktin (R, Pfeil).

4.7.3 Die Lokalisation von Duf/Kirre ist abhängig von Sns; ansonsten wurde keine Abhängigkeit der Membranlokalisation von Duf/Kirre, Sns und Rols7 von verschiedenen Komponenten der Fusionsmaschinerie nachgewiesen

Da es sich bei der Myoblastenfusion um die Fusion zweier benachbarter Plasmamembranen handelt, ist davon auszugehen, dass die Lokalisation von Faktoren wie Duf/Kirre und Sns in der Membran und Rols7 an der Plasmamembran essentiell für diesen Prozess ist. Die Abhängigkeit der Rols7- und der Schizo-Lokalisation von Duf wurde bereits nachgewiesen, ebenso dass die Lokalisation von Titin Rols7 abhängig ist (Menon and Chia, 2001; Chen et al., 2003). Um zu überprüfen, ob weitere myogeneserelevante Proteine wie Blow, Kette, Schizo, Rols7 oder Mbc an der Lokalisation von Duf oder Sns an der Plasmamembran beteiligt sind, wurde die Verteilung dieser Proteine in den jeweiligen Mutanten analysiert. Im Falle Duf/Kirre-Proteins wurde zusätzlich die Abhängigkeit der Proteinlokalisation von Sns überprüft. Für Rols7 wurde ebenfalls analysiert, ob die Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran abhängig von Blow, Kette, Schizo oder Mbc ist. Gleichzeitig wurde getestet, ob die Komponenten bei einer erfolgreichen Lokalisation an bzw. in der Plasmamembran noch die typische ringförmige Anordnung aufweisen. Außerdem wurde analysiert, ob die Störung der Myoblastenfusion mit Störungen im Aufbau des adhesiven Komplexes aus Duf/Kirre und Rols7 auf Seite der Founderzelle und Sns auf Seite der FCMs einhergeht.

Der Nachweis von Duf/Kirre und Sns in den Embryonen mit Mutationen in den Genen *mbc*, *kette*, *schizo*, *blow* und *rols* zeigt, dass die Lokalisation von Duf/Kirre und Sns an die Membran unabhängig von der Aktivität der jeweiligen Genprodukte erfolgt. Der Nachweis von Rols7 in Embryonen mit Mutationen in den Genen *mbc*, *kette*, *schizo* und *blow* zeigt, dass dies ebenfalls für Rols7 gilt. Auch die ringförmige Anordnung von Rols7, Duf/Kirre und Sns kann in diesen Mutanten noch nachgewiesen werden (Abb. 4.7.3a). Aufgrund der Anhäufung von unfusionierten Myoblasten an der Kontaktstelle zu den Founderzellen ist die Auflösung des Ringes

jedoch nicht in allen Fällen möglich. Das Ausbleiben der Fusion geht bei *mbc*-, *kette*-, *schizo*- und *blow*-Mutanten mit einer Akkumulation von Rols/7, Duf/Kirre und Sns in den Founder bzw. Precursorzellen einher, so dass relativ große Proteinmengen an der Membran dedektiert werden und bis zum Stadium 16 nachgewiesen werden können. Nur bei *mbc*-Mutanten konnte in späten Stadien der Embryonalentwicklung relativ große von Ringstrukturen mit einem Durchmesser von mehr als 2 µm beobachtet werden. Diese fanden sich an den Kontaktstellen von zahlreichen FCMs mit der Founderzelle auf Seiten der Founderzelle (nachweisbar mit anti- Duf/kirre bzw. mit anti- Rols). Bei *mbc*-Mutanten kann ähnlich wie bei *blow*-Mutanten beobachtet werden, dass die unfusionierten Myoblasten nur an wenigen Stellen Kontakt zur Founder/Precursorzelle aufnehmen und dort die Filopodien zahlreicher Myoblasten zusammentreffen. Die anderen Mutanten weisen eine abweichende Anordnung der FCMs mit einer mehr oder weniger gleichmäßigen Verteilung um die Founder/Precursorzelle herum auf (Daten nicht gezeigt). Bei *rols*-mutanten Embryonen der Linien U54650 (Df(3L)BK9) und des EMS-Allels AD328 kommt es nicht zur Akkumulation der Proteine Duf/Kirre und Sns in den Zellen. Im Stadium 16 können sowohl Duf/Kirre als auch Sns noch an der Membran dedektiert werden, aber in deutlich geringer Konzentration als bei anderen untersuchten Fusionsmutanten und bei einer reduzierten Anzahl der Kontaktstellen von FCMs zu Founder/Precursorzellen (Abb. 4.7.3a), da nur noch wenige FCMs Kontakt zu einer Precursorzelle haben. In FCMs die keinen Kontakt zu einem Precursor haben ist keine ringförmige Verteilung von Sns mehr zu beobachten.

Im Falle des *sns*-Nullallels *sns*²⁰ kann beobachtet werden, dass das Duf-Protein an der Membran lokalisiert ist dabei jedoch keine punktförmige Verteilung aufweist. Besonders in den späteren Stadien kann eine verstärkte Akkumulation des Proteins über relativ große Membranareale im Bereich der Kontaktstelle zweier Founder beobachtet werden (Abb. 4.7.3b).

Bei einigen der Mutanten (z.B. *blow*- Mutanten) können nach der Phagozytose der FCMs auf Seiten der Founder/Precursorzellen ringförmige adhäsive Komplexe beobachtet werden die keinen Zellkontakt mehr zu einer FCM haben.

Um zu überprüfen, ob zur Etablierung der adhäsiven Komplexe der Zellkontakt notwendig ist wurde die Verteilung des Rols-Proteins in Mutanten für das Gen *delta* analysiert. Delta ist zusammen mit Notch der Mediator der lateralen Inhibition und Embryonen die homozygot für Mutationen im *Delta*-Locus sind sollten keine FCMs

mehr ausbilden. Bei *Delta*-Mutanten (Allel Df^{B2}) kann Rols7 an der Membran in ringförmiger Anordnung dedektiert werden. Im Bereich dieser Kontaktstellen können eindeutig Zellen die in direktem Kontakt zur Founderzelle stehen nachgewiesen werden (Abb. 4.7.3b).

Ergänzend zu dem Nachweis der Sns, Duf/Kirre und Rols7-Proteinverteilung in den *mbc*- Mutanten Embryonen wurde eine die Protein-Verteilung von Duf/Kirre in *rac1*, *rac2*- Doppelmutanten analysiert. Bei Rac1 und Rac2 handelt es sich möglicherweise um Effektoren von Mbc (Erickson et al., 1997, Nolan et al., 1998 und Cote and Vuori, 2002). Es zeigt sich, dass die *rac1*, *rac2*- Doppelmutante auf dem gleichen Niveau wie Mbc stoppt und dabei die ringförmige Duf/Kirre Proteinverteilung beibehält (Abb. 4.7.3b). Auch richten sich zahlreiche Myoblasten sternförmig auf einen Punkt einer Founderzelle (Abb. 4.7.3b, D), dies kann auch bei *mbc*-Mutanten beobachtet werden.

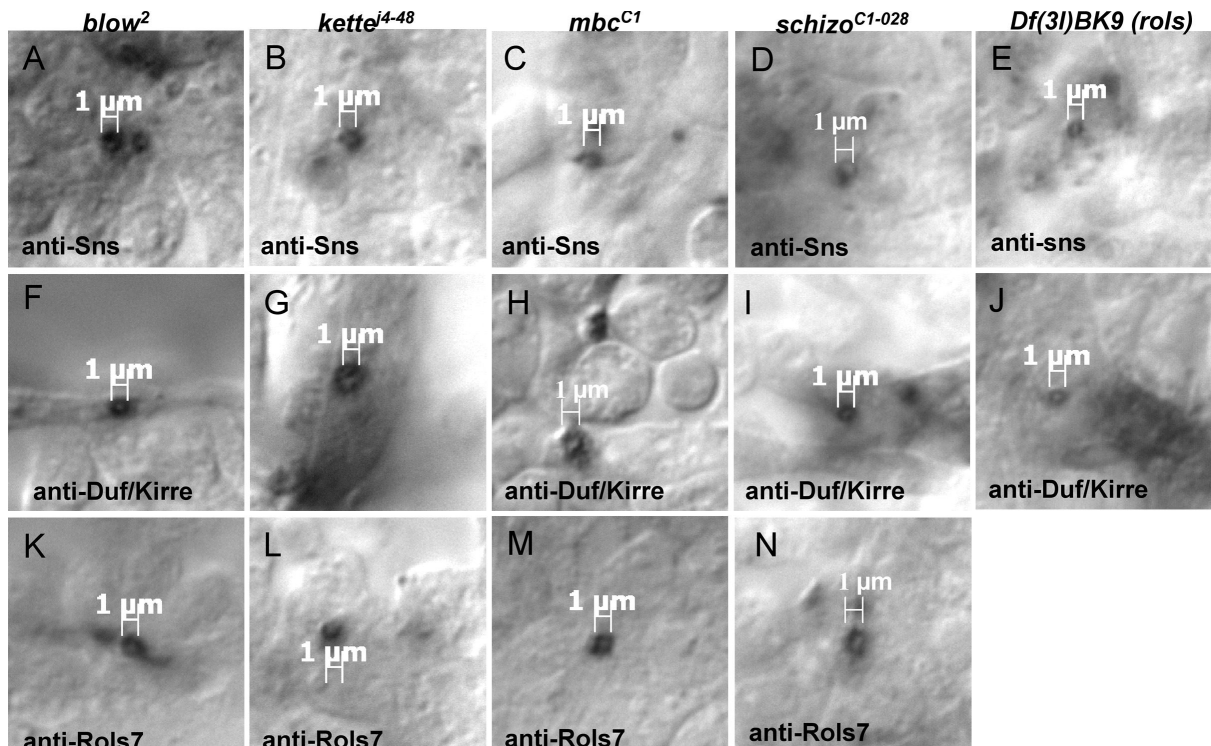


Abb. 4.7.3a: Nachweis der Protein-Lokalisation von Sns, Duf/Kirre und Rols7 in mutanten Embryonen (Stadium 15/16) der Gene *blow* (A, F, K), *kette* (B, G, L), *mbc* (C, H, M), *schizo* (D, I, N) und *rols* (E, J). Alle gezeigten Mutanten sind in der Lage Sns, Duf/Kirre und Rols7 an der Kontaktstelle von FCM und Founder/Precursorzelle zu akkumulieren (z.B. Bild H). Die ringförmige Struktur kann in Founder/Precursorzellen teilweise ohne eine in Kontakt stehende Myoblaste beobachtet werden (F).

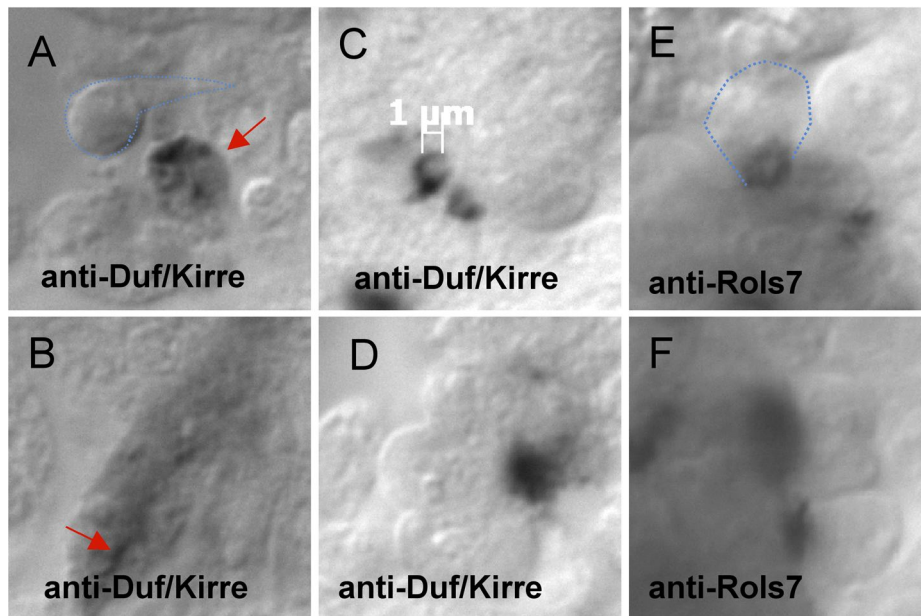


Abb. 4.7.3b: Nachweis der Protein-Lokalisation von Duf/Kirre in *sns*-mutanten Embryonen (A, B) und in *rac1*, *rac2*- Doppelmутanten (C, D) und von Rols7 in *delta*-mutanten Embryonen. Die Duf/Kirre Verteilung in den *rac1*, *rac2*-Doppelmутanten entspricht dabei weitestgehend dem wildtypischen Muster. In *sns*- Mutanten hingegen ist Duf/Kirre an der Membran der Founderzellen lokalisiert, trotzdem erfolgt kein Kontakt der FCM (A, FCM grau gestrichelt umrandet). Später akkumuliert das Protein verstärkt an den Kontaktstellen von Founderzellen (B, roter Pfeil). Hingegen kann bei *delta*- mutanten Embryonen die ringförmige Struktur (hier mit einem Rols7-Antikörper) noch deutlich nachgewiesen werden. Diese befinden sich an der Kontaktstelle von relativ großen Zellen (vermutlich Founder/Precursorzellen und kleineren Zellen (vermutlich FCMs) (E, F).

5. Diskussion

Bei der Myoblastenfusion handelt es sich um einen essentiellen Differenzierungsschritt in der Myogenese von *Drosophila melanogaster*. Unterbleibt dieser Schritt oder ist er aufgrund von Gendefekten schwer gestört führt dies zu spätembryonaler Letalität, da Embryonen mit einem solchen Defekt nicht in der Lage sind zu schlüpfen. Aufgrund vorangegangener Analysen des Phänotyps von *rolling pebbles* Mutanten konnte gezeigt werden, dass das Rols7-Protein innerhalb dieses Prozesses eine entscheidende Rolle hat und der Funktionsverlust des Gens zu Störungen in der Myoblastenfusion und somit zu embryonaler Letalität führt (Rau et al., 2001; Menon und Chia, 2001, Chen and Olson, 2001).

Neben der Funktionalität des von einem Gen codierten Protein ist für die Entwicklung und Differenzierung eines Organismus die spezifische Expression dieses Proteins ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist z.B. eine räumlich und zeitlich spezifische Transkription des Gens, aber auch der spezifische Ablauf von posttranskriptionalen Vorgängen wie z.B. die Translationsinitiation oder die mRNA-Degradation.

Um zu gewährleisten, dass die Embryogenese von *D. melanogaster* korrekt abläuft ist für das *rols7*-Gen eine Restriktion der Genexpression auf das somatische und viszerale Mesoderm zu fordern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht welche Mechanismen dieser Regulation zu Grunde liegen und welche Faktoren möglicherweise involviert sind. Weiterhin wurden Aspekte der Protein- und der mRNA-Lokalisation und der Proteinfunktion während der Myoblastenfusion untersucht.

5.1 Die Transkription von *rols7* wird durch einen ungewöhnlichen 3' vom Transkriptionsstart lokalisierten Promotor gesteuert

5.1.1 Die Transkription von *rols7* ist unabhängig vom *rols6*- Promotor

Das *rolling pebbles*-Gen codiert für zwei Proteine unterschiedlicher Größe und Funktion. Nur das größere Protein Rols7 wird in der Myogenese für die

Myoblastenfusion benötigt (Rau et al., 2001; Chia et al., 2001) während *ROLS6* bei der Morphogenese der Malphigie-Gefäße benötigt wird (Pütz et al., 2005). Bei dem Screening einer cDNA-Bank wurde für jedes Protein eine korrespondierende cDNA identifiziert. Die Bildung verschiedener mRNAs von einem Gen kann entweder auf ein differentielles Spleißen einer gemeinsamen Prä-mRNA zurückzuführen sein oder es werden bereits distinkte Prä-mRNAs transkribiert. Werden unterschiedliche Prä-mRNAs gebildet, muss die Transkriptionsinitiation getrennt voneinander reguliert werden- d.h. für variierende Transkripte müssen unterschiedliche Promotoren existieren. Wie vorhergehende Promotorkonstruktanalysen bereits zeigten ist ein ca. 1.1 kb umfassendes Fragment 5' des *ROLS6*-Transkriptionsstarts in der Lage eine *ROLS6* spezifische Reportergenexpression zu steuern. Dieses Promotorkonstrukt zeigt keine Expression in mesodermalen Derivaten (Dissertation Michael Pütz, 2004), was auf eine unabhängige Regulation von *ROLS6* und *ROLS7* hindeutet. Für den putativen Promotorbereich des *ROLS6*-Transkripts wurde durch den jump out eines P-Elements (EP(3)3330) eine kleine Deletion erzeugt (EP(3)3330*5a) die fast gesamten Promotorbereich umfasst. In Embryonen dieser Linie kann nur noch das *ROLS7*-Transkript nachgewiesen werden (s. Punkt 4.1 Abb. 4.1) (Dissertation Pütz 2004; Pütz et al., 2005). Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass für die Transkriptionsinitiation von *ROLS6* und *ROLS7* unabhängig voneinander erfolgt und von zwei distinkten Promotoren abhängig ist.

5.1.2 Die *ROLS7* mRNA ist 258 bp länger als die *ROLS7* LDcDNA; im Bereich des Transkriptionsstart ist kein klassisches Core-Promotor- Element lokalisiert

Aufgrund von RT-PCR-Experimenten erschien es zunächst wahrscheinlich, dass der Transkriptionsstart des *ROLS7*-Gens in einem Fenster von ca. 50-60 bp upstream der ersten Base der *ROLS7*-LDcDNA erfolgt (s. Anhang). In diesem Fenster ist eine Basensequenz TCAATT lokalisiert die bis auf eine Base mit der Consensus-Sequenz T C A ₊₁ G/T T T/C eines Initiator- Elements bei *D. melanogaster* übereinstimmt (Purnell et al., 1994). 3' von diesem Bereich ist ein DNA-Abschnitt lokalisiert der den Anforderungen eines DPE an die Entfernung und der Basenabfolge (Functional Range Set des DPE in der Position 24 ein G und in der Position +28-+33: A/G/T C/G A/T C/T A/C/G C/T; Kutach and Kadonaga, 2000) vom Initiator entsprechen würde- d.h. 24 bp von der Adeninbase des putativen Initiators

befindet sich ein G und in der Position 28 bis 33 bp relativ zum Adenin die Basen GGATAC (s. Anhang). Um zu überprüfen ob diese Elemente tatsächlich in die Transkriptionsinitiation von *rols7* involviert sind, wurde der Transkriptionsstart über RT-PCR zunächst eingegrenzt und dann mit Hilfe einer Primer-Extension Reaktion festgelegt. Durch die RT-PCR konnte eine cDNA amplifiziert werden die den Beginn des 2. *rols7* Exons und ein 1. Exon mit einer Länge 543 bp umfasst (s. Anhang). Die Primer-Extension ergab ein Cytosin als Transkriptionsstart welches 13 bp vom 5' Ende der in der RT-PCR amplifizierten cDNA und 258 bp vom 5' Ende der *rols7*-LDcDNA lokalisiert ist (s. Anhang). Dieser Transkriptionsstart wird von dem Programm McPromoter aus einer 1700 bp umfassenden Sequenz ebenfalls vorhergesagt. Die Analyse der Sequenz durch McPromoter erfolgte bei einem Cut Off Value von 0.8 und erzielte einen Score von 0.892. Bei einem Score von 0.9 liegt die Sensitivität bei 52.1% (d.h. 52.1 % der tatsächlich vorhandenen Transkriptionsstarts werden erkannt) und die Spezifität bei 40.3% (d.h. bei 40.3% der vorhergesagten TSS handelt es sich um einen Transkriptionsstart). Die Rate der falsch positiven liegt bei 1/12016 pro Base. Diese Werte wurden anhand des Adh-Locus ermittelt (Ohler et al., 2002).

Aufgrund der korrespondierenden Daten aus der RT-PCR, der Primer- Extension und der Vorhersage von McPromoter erscheint es wahrscheinlich, dass die *rols7*-Transkription bei dem ermittelt Cytosin beginnt und somit die Base +1 der mRNA darstellt (s. Anhang). Die in den folgenden Teilen der Diskussion vorgenommen Positionsangaben beziehen sich auf diesen experimentell ermittelten Transkriptionsstart.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der zunächst vermutete Initiator und das DPE nicht die angenommen Funktion von Core-Promotor Elementen innehaben können, da der Core-Promotor deutlich weiter 5' lokalisiert ist. Der Core-Promotor muss per Definition das als Transkriptionsstart ermittelte Cytosin flankieren. Ein Cytosin als Transkriptionsstart entspricht nicht der Regel, da es eine starke Präferenz für ein Adenin als erste Base der mRNA gibt, relativ unabhängig von den anderen Core-Promotor Elementen (Kutach and Kadonaga, 2000). Allerdings wurde für Core-Promotoren, die einen Initiator in Kombination mit einem MTE enthalten das Cytosin in der Position -1 des Initiators als Transkriptionsstart ermittelt (Lim et al., 2004). Die das Cytosin flankierenden Sequenzen des *rols7*-Promotors weisen keine bekannten Core-Promotor Elemente wie einen Initiator sowie TATA-Box, BRE, DRE; TC-Box im

5' Bereich bzw. ein DPE oder ein MED-Element 3' des Transkriptionsstarts auf. Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass die Rekrutierung der generellen Transkriptionsfaktoren an den *rols7*-Promotor durch bisher noch nicht charakterisierte Core-Promotor Elemente vermittelt wird; ein möglicher Kandidat wäre das durch Sequenzanalyse von Core-Promotoren durch Ohler et al. 2002 ermittelte Motiv 6 mit der Consensus-Sequenz KTYRGATWTTT. Ein dieser Sequenz ähnlicher DNA-Abschnitt beginnt in der Position +28 und endet in der Position +40; s. Anhang), es ist jedoch anzumerken, dass die Sequenz in 3 Basen vom Consensus differiert und eine Position ca. 30 bp downstream vom Transkriptionsstart ungewöhnlich ist.

5.1.3 Die vergleichende Analyse der Reportergenkonstrukte RPL, ROPOZ, ROPOE, MEBOX und OEBOX zeigt, dass zwischen der Position – 875 und –1392 ein Enhancer-Element lokalisiert sein muss, welches die Expressionshöhe von *rols7* beeinflusst

Um die cis-regulatorische Elemente des *rols7*-Promotors zu charakterisieren wurden zunächst ein DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 3 kb (von der Position + 537 bis – 2382, ausgehend von dem experimentell ermittelten Transkriptionsstart), 2 kb (+ 537 bis – 1392) und 1 kb (+ 537 bis –442) untersucht. Das 3 kb Fragment (RPL) umfasst hierbei fast den gesamten 5' Bereich von *rols7* bis zum *semaphorin5c*- Gen (s. Abb. 4.2). Es zeigte sich, dass dieses Fragment in der Lage ist eine spezifische Reporterexpression im somatischen Mesoderm zu steuern, die mit der beobachteten Expression von in *rols7* in diesem Gewebe weitgehend übereinstimmt. Allerdings wird die β -Galactosidase länger (bis Stadium 16/17) als Rols7(bis Stadium 15) exprimiert, außerdem kann das Reporter-Gen-Produkt im Gegensatz zum Rol7-Protein auch transient in den fusionskompetenten Myoblasten und im Dorsalgefäß nachgewiesen werden (Punkt 4.2.1; Abb. 4.2.1 C+ D) Der spätere Nachweis des Reportergens ist wahrscheinlich auf die erhöhte Stabilität der β -Galactosidase zurückzuführen. Die Expression des Reportergens in den FCMs und dem Dorsalgefäß könnte aufgrund der Deletion eines Silencer in dem Reportergenkonstrukt erfolgen. Ein solcher Silencer könnte weiter 5' in Richtung des Semaphorin-Gens oder 3' des ersten *rols7*-Exons lokalisiert sein. Im Falle der Reporterexpression in den FCMs ist auch nicht auszuschließen, dass dieser

Zelltypus tatsächlich transient *rols7* transkribiert (wie es im viszeralem Mesoderm der Fall ist, s. Punkt 4.2.9) aber diese transkriptionelle Aktivität noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Kürzere Reportergenkonstrukte wie ROPOZ und ROPOE (+537 bis –1392 und +537 bis –442) zeigen ein räumlich übereinstimmendes Expressionmuster, aber bei der Analyse der Reportergenexpression von ROPOE (1 kb) ist eine deutliche Reduktion im Expressionsniveau feststellbar. Dies lässt auf einen Enhancer im Bereich –1392 bis –442 schließen. Anhand der Analyse der Reportergenexpression der 1365 bp umfassenden (–1392 bis –27) Enhancer-Test-Konstrukte pH7 und pH10 wurde dies bestätigt. Die Enhancertest-Konstrukte zeigen, dass der getestet Abschnitt in der Lage ist richtungsunabhängig eine Reportergenexpression in somatischen Mesoderm und im Pharynx zu steuern (Abb. 4.7.2 B). Auffallend ist hier die ungleichmäßige Expressionshöhe in den Precursorzellen des somatischen Mesoderm. Möglicherweise erfolgt über das hier lokalisierte Element eine vom individuellen Muskel abhängige Modulation der Rols7-Expressionshöhe, die für die Bildung von Muskeln unterschiedlicher Größe notwendig ist. Eine Beteiligung von Rols7 an der Regulation der Muskelgröße wird in der Literatur diskutiert (Menon et al., 2005) .

Auf DNA Ebene zeigt sich, dass sich hier insgesamt fünf E-Boxen bzw. E-Box ähnliche Motive mit dem Consensus CANNTG befinden (Position –1046 bis –1040; –793 bis –787; –774 bis –768; –651 bis –645 und –645 bis –639, (s. Anhang und Abb. 4.2). Bei den E-Boxen handelt es sich um Bindestellen für Transkriptionsfaktoren die zur Familie der basische Helix-Loop-Helix- Proteine gehören (Murre et al., 1989). Das Genom von *D. melanogaster* codiert für 56 Proteine die zu dieser Familie gehören (Peyrefitte et al. 2001). Von diesen 56 Proteinen werden zahlreiche während der mesodermalen Entwicklung exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Gene während der Myogenese benötigt werden. Zu diesen Genen gehört z.B. *twist*, das für die Spezifikation und Differenzierung des Mesoderms benötigt wird (s. Einleitung). Ein weiteres bHLH-Gen das ähnlich wie *twist* exprimiert wird ist *shout* (Moore et al., 2000). Bei der Spezifikation von Founder- und fusionskompetente Zellen spielen die Gene des *enhancer of split*-Komplexes eine wichtige Rolle (Giebel, 1999). Diese Gene sind direkte Ziele von Notch; dieser Faktor ist der Mediator der lateralen Inhibition in der Neurogenese und in der Myogenese. Auch das *Drosophila*-Homolog Nautilus der wichtigsten myogene

Determinationsfaktoren (MyoD; MRF4 und Myf5) bei Vertebraten gehört zur Familie der bHLH-Proteine und ist an der Spezifikation einiger Muskelprogenitoren beteiligt (Balagopalan et al. 2001).

Die vergleichende Analyse der Konstrukte MEBOX (+ 537 bis –875) welches eine putative E-Box in der Position –1046 bis –1040 deletiert und OEBOX (+ 537 bis –629) welches alle fünf E-Box ähnlichen Elemente deletiert zeigt, dass beide Konstrukte eine mit ROPOE übereinstimmende Reporterexpression steuern (s. Abb 4.2). Die beobachtete Modulation der Expressionshöhe zwischen ROPOZ und ROPOE muss also auf einen Enhancer im Bereich der Basen –1392 und –875 zurückzuführen sein. Hier ist nur eine der putativen E-Boxen lokalisiert (Abb. 5.1) die an der Co-Aktivierung der *rols7*-Transkription beteiligt sein könnte.

5.1.4 Die Deletion des 5' vom Transkriptionsstart gelegenen Bereich lässt darauf schließen, dass die wichtigsten Promotorelemente 3' des TSS lokalisiert sind und dass die Transkriptionsinitiation unabhängig von einer ETS-Bindestelle in der Position –28 bis –14 ist

Die weitere Verkürzung der Reportergenkonstrukte ergab, dass das Konstrukt ROPOH (+ 537 bis –43) ausreichend für die räumlich und zeitlich spezifische Expression von *rols7* in den Founderzellen (+ den in Punkt 5.1.3 beschriebenen Zusatzexpressionen im Dorsalgefäß und in den FCMs) auf einem ähnlichen Expressionsniveau wie das ROPOE-Konstrukt ist. Im Bereich von –29 bis –15 wird durch das Programm TF-Search eine ETS-Bindestelle vorhergesagt. Diese Bindestellen haben einen Core-Consensus mit der Sequenz GGAA und werden durch Proteine der ETS-Familie erkannt. Zu dieser Familie gehören die Gene *pointed* und *yan/aop*; von beiden Genen ist bekannt, dass sie mesodermal exprimiert werden (Klämbt et al., 1993; Scholz et al., 1993; Price and Lai, 1999). Am Beispiel des Muskels Dorsal Acute 1 konnte gezeigt werden, dass Yan und Pointed als Antagonisten an der Determination von Progenitoren beteiligt sind (Halfon et al., 2000).

Aufgrund eines bei EMS-Allelen des *pointed*-Gens beobachteten Fusionsphänotyps wurde getestet, ob diese Sequenz in der *rols7*-Regulation funktional ist. Ein Promotor-Konstrukt welches die ETS-Bindestelle fast vollständig deletiert und den Core-Consensus GGAA nicht mehr enthält (OETSB; +537 bis –19) zeigt jedoch

immer noch eine spezifische Reporterexpression. Da in dem getesteten Konstrukt keine weitere ETS-Bindestelle vorhanden ist, ist eine Beteiligung eines ETS-Transkriptionsfaktors an der spezifischen Regulation von *rols7* unwahrscheinlich (s. auch Punkt 5.3.2). Allerdings ist das Niveau der Reporterexpression gegenüber dem von ROPOH gesteuerten Niveau abgeschwächt, so dass ein ETS-Faktor als Koaktivator der *rols7*-Transkription nicht ausgeschlossen werden kann.

Weitere verkürzte Konstrukte wie RMEFP (+537 bis +12) das noch die durch TFSearch vorhergesagte Mef2-Bindestelle enthält, ROPO2 (+537 bis +55) und ROPO1 (+537 bis +169) die ebenso wie RMEFP noch eine Nautilus-Bindestelle (s. Punkt 5.1.3) enthalten zeigen keine spezifische Expression mehr. Aufgrund des fehlenden Transkriptionsstarts lässt sich in diesem Zusammenhang über die Funktionalität dieser Elemente keine Aussage treffen.

Das Konstrukt OETSB enthält nur noch 19 bp die 5' des TSS lokalisiert sind und zeigt trotzdem noch eine spezifische Expression (zur Kontrolle wurde der leere Vektor pChab Δ Sal gefärbt). Da selbst die bekannten 5' gelegenen Core-Promotor Elemente wie die TATA-Box (Position -25 bis -30) weiter vom TSS entfernt sind ist davon auszugehen, dass die spezifische Regulation von *rols7* im 3' gelegenen Leaderbereich des Gens lokalisiert ist. Von diesem sind in allen Konstrukten 537 bp enthalten sind (s. Anhang). Dies gilt sowohl für den Core-Promotor als auch für proximale und distale Promotor-Elemente. Wie bereits in Punkt 5.1.3 beschrieben können keine bekannten Core-Promotor-Elemente 3' des TSS identifiziert werden.

5.1.5 3' Deletionen des Leaderbereichs in der Position +453, +340 und +237 haben keinen Einfluss auf die Reporterexpression und belegen, dass ein Fragment von 256 bp die wichtigsten *rols7* regulierenden Elemente enthält

Aufgrund der Beobachtung dass 19 bp upstream des Transkriptionsstarts ausreichend sind für die Initiation der spezifischen Transkription und der daraus erfolgenden Schlussfolgerung, dass die Regulation der Transkription weitestgehend über den Leaderbereich des Gens erfolgen muss, wurden weitere von dem 2 kb umfassenden Konstrukt ROPOZ ausgehende Konstrukte untersucht, die den Leaderbereich von der Position +453 (RolsDex1), +340 (RolsDex2) und +237 (RolsDex3) deletieren. Sowohl RolsDex1 als auch RolsDex2 enthalten eine durch TFSearch vorhergesagte putative Ubx-Bindestelle (-335 bis -316); da Ubx

spezifische in den Founderzellen exprimiert ist (Artero et al., 2003) könnte dieser DNA- Abschnitt an der Regulation beteiligt sein. Die Analyse der Reporterexpression von RolsDex1, 2 und 3 belegt, dass diese eine mit der Expression des Ausgangskonstrukt ROPOZ übereinstimmende Reporterexpression steuern. Somit ist eine Funktionalität der Ubx-Bindestelle auszuschließen und der für die *rols7*-Transkription essentielle Bereich ist auf 256 bp eingegrenzt. Von diesen 256 Basen entfallen 237 bp auf den Leader des Gens (Abb. 5.1).

5.1.6 Die cis-regulatorische Elemente für die Expression von *rols7* im viszeralem Mesoderm sind im 1. Intron des Gens lokalisiert

Aufgrund der Beobachtung das auch das 3 kb umfassende Konstrukt RPL nicht in der Lage ist eine Reporterexpression im viszeralem Mesoderm zu treiben, ist eine unabhängige viszerale Regulation von *rols7* wahrscheinlich.

Um dies zu überprüfen, wurde die Reporter-Expression des Enhancer-Konstrukts Roln1 analysiert, welches das gesamte erste *rols* Intron umfasst. Dieses Konstrukt treibt eine β -Galactosidase-Expression in den Vorläufern der longitudinalen und der zirkulären viszeralem Muskulatur. Da eine Expression von *rols7* in der longitudinalen viszeralem Muskulatur noch nicht beschrieben war, wurde die Transkription von *rols7* in diesem Gewebe anhand von *whole mount in situ* Hybridisierungen bestätigt. Zusätzlich wurde bei Embryonen mit einer Integration des Roln1-Konstrukts die β -Galactosidase in den Malphigie-Gefäße, der Amnioserosa und einem Subset der Vorläufer der somatischen Muskulatur dedektiert (s. Punkt 4.2.8). Die Kontroll-Färbung des leeren pCaSpeRHs43-Vektor zeigte, dass der leere Vektor eine Expression des Reportergens in den Vorläufern der longitudinalen viszeralem Muskulatur und in den Malphigie-Gefäßen treiben kann. Durch die beobachtete Backgroundexpression des Vektors kann nicht beurteilt werden ob im 1. Intron des *rols*-Gens ein Enhancer zur Steuerung der *rols7*-Expression im longitudinalen viszeralem Mesoderm lokalisiert ist, während die Lokalisation eines Enhancers für die zirkuläre viszerale Muskulatur im 1. Intron als gesichert gelten kann. Die beobachtete Expression in Teilen der somatischen Precursorzellen lässt ein weiteres, expressionsmodulierendes Enhancerelement für das somatische Mesoderm vermuten (Abb. 5.1). Die Expression in der Amnioserosa könnte auf ein

rols6 spezifisches Enhancerelement hinweisen, da das Transkript von *rols6* in der Amnioserosa nachgewiesen werden konnte (Rau, Dissertation). Um die cis-regulatorischen Elemente im 1. Intron des *rols*- Gens weiter einzugrenzen und den longitudinalen viszeralen Enhancer zu lokalisieren, wäre die Untersuchung kleinere Fragmente des 1. Introns und die Verwendung eines alternativen Vektors wie z.B. pH-Pelican sinnvoll.

Bisher nicht geklärt ist die Bedeutung der im Rahmen der *in situ*-Hybridisierungen festgestellten *rols7*-Expression in den fusionskompetenten Myoblasten des zirkulären viszeralen Mesoderms.

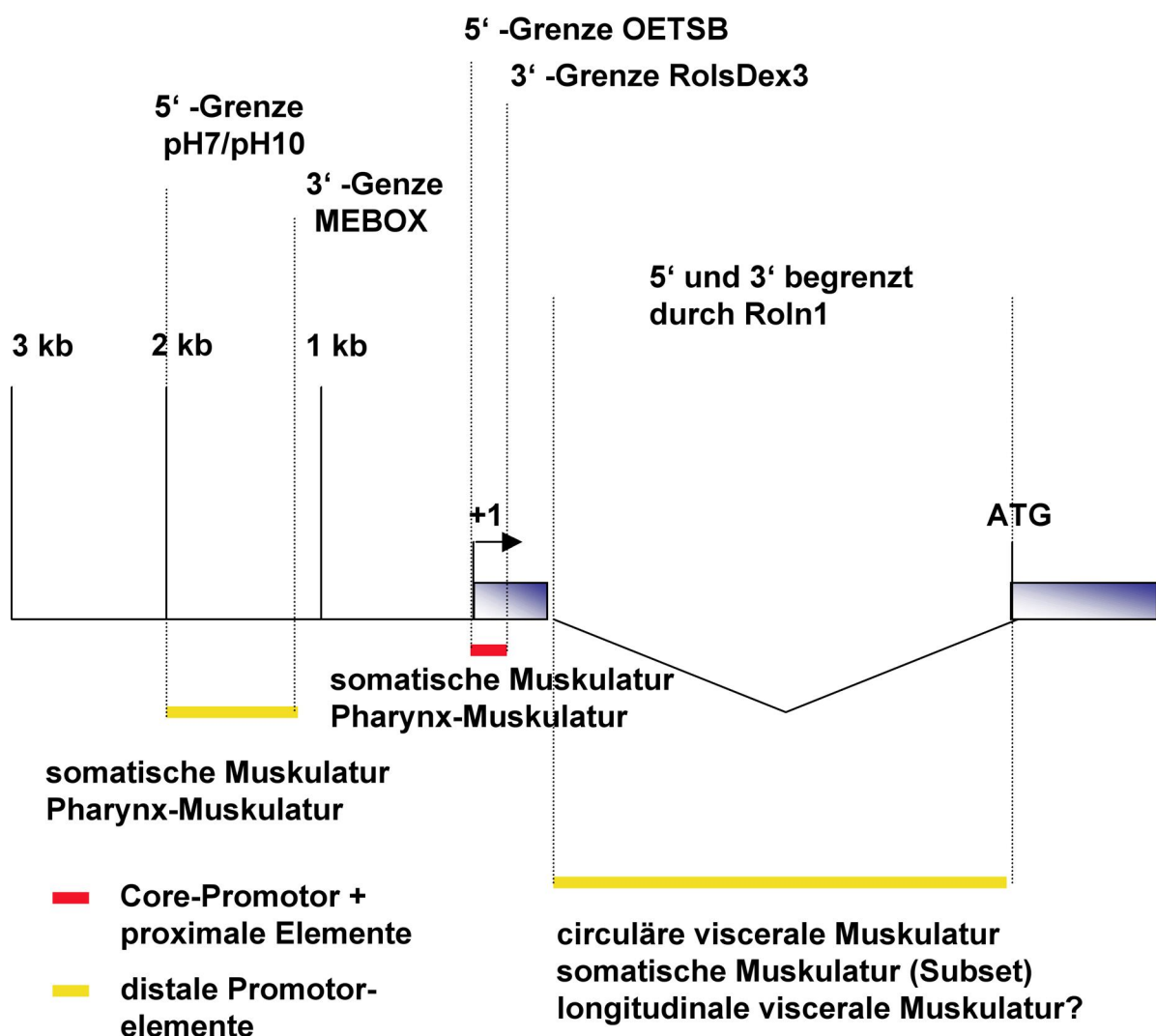


Abb. 5.1: schematische Darstellung der *rols7*-Promotorregion: Gekennzeichnet wurden der Transkriptionsstart (C in der Position +1) und der direkt anschließenden proximalen Promotorbereich (-19 bis +237), das distalen Promotor-Element für die somatische und die Pharynx-Muskulatur (-875-1392) und das cis-regulatorisch funktionale 1. Intron.

5.2 Das *rols*-Gen und ist zwischen *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* konserviert und zeigt in beiden Arten ein übereinstimmendes Expressionsmuster; außerdem ist die Regulation der Transkription von übereinstimmenden DNA-Abschnitten abhängig

Um die cis-regulatorischen Elemente eines bestimmten Gens zu identifizieren, kann es hilfreich sein die Sequenz der Promotorregion des Gens mit der korrespondierenden Sequenz dieses Gens bei einer nicht zu nah verwandten Art zu vergleichen. Da Mutationen in den cis-regulatorischen Elementen zum Genausfall oder zur Überexpression des Genes führen können, ist davon auszugehen, dass sich Mutationen in cis-regulatorische Elementen weniger schnell anhäufen als in nicht funktionalen DNA-Bereichen und diese auch in weniger nah verwandten Arten konserviert sind.

Aufgrund von Phänomen wie Co-Evolution und stabilisierender Selektion (s. Einleitung Punkt 1.7) darf die evolutionäre Distanz jedoch auch nicht so groß sein. Die *Drosophiliden*- Arten *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* weisen eine evolutionäre Distanz von ca. 25-55 Millionen Jahren auf. Bei *Drosophila pseudoobscura* handelt es sich um die zweite Art, deren Genom sequenziert wurde (Richards et al., 2005).

5.2.1 Das *rols*-Gen ist in *Drosophila pseudoobscura* konserviert und wird in den gleichen Geweben exprimiert wie das *D. melanogaster rols*

Um einen Vergleich der Promotorregion eines Gens zur Identifikation von cis regulatorische Elementen durchzuführen muss sicher gestellt werden, dass es sich bei diesem Gen nicht um eine Autapomorphie einer der beiden Arten handelt. Im Rahmen der Sequenzierung des *D. pseudoobscura*-Genoms wurde für 1485 Gene von *D. melanogaster* bisher kein *D. pseudoobscura* Ortholog identifiziert. Dies entspricht 10.9% der vorhergesagten oder bekannten *D. melanogaster* Gene. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Zahl sich noch reduziert, da sowohl bei der Sequenzierung des *D. melanogaster* Genoms als auch der Sequenzierung des *D. pseudoobscura* Genoms Lücken vorhanden sind. Gene für die kein Ortholog

identifiziert werden kann, sind entweder Gene mit einer hohen Evolutionsrate oder neu entstandene Gene (Richards et al., 2005).

Blastet man die Nukleotidsequenz von *D. melanogaster* mit dem Genom von *D. pseudoobscura* (UCSC Genome Browser v77 with VISTA tracks) zeigt sich, dass das *rols* Gen konserviert und auf dem chromosomalen Arm XR lokalisiert ist. Dieser entspricht dem 3L Arm der Chromosomen von *D. melanogaster*. Auf diesem Arm befindet sich bei *D. melanogaster* das *rols*-Gen in der Position 68F. Die chromosomale Lokalisation des Gens ist somit erhalten geblieben. *In situ* Hybridisierungen an *D. pseudoobscura*- Embryonen mit einer RNA-Sonde, die komplementär zum 3'- Bereich der *rols6* und *rols7* mRNA von *D. melanogaster* ist, zeigen, dass diese Sonde (die Konservierung des c-terminalen Bereichs liegt auf Nukleotidebene bei ca. 80%) in der Lage ist das GA 16675-RA Transkript im somatischen und viszerale Mesoderm zu dedektieren. Außerdem dedektiert diese Sonde Transkripte im AMG und PMG sowie in den Malphigie-Gefäßen. Dies entspricht den *Rols6* exprimierenden Geweben und ist vermutlich auf das *rols6*-Transkript von *D. pseudoobscura* (analog zu *rols7* mit GA 16675-RB bezeichnet) zurückzuführen. Die exprimierenden Embryonalstadien korrespondieren mit den *rols*-exprimierenden Stadien bei *D. melanogaster*. Der Nachweis der Expression sowohl von *rols6* als auch *rols7* in Embryonen in korrespondierenden Stadien und übereinstimmenden Geweben bestätigt, dass es sich bei dem vorhergesagten Gen tatsächlich um *rols* handelt. Die Ähnlichkeit der Expression lässt vermuten, dass *rols6* und *rols7* in der Embryogenese von *D. pseudoobscura* ähnliche Aufgaben wie bei *D. melanogaster* übernehmen und in der Myogenese und der Morphogenese der Malphigi-Gefäße benötigt werden (Chen and Olson, 2001; Menon und Chia, 2001; Rau et al., 2001; Pütz et al., 2005).

5.2.2 Die Promotorregionen von *rols6* und *rols7* sind zwischen *Drosophila melanogaster* und *Drosophila pseudoobscura* funktional konserviert

Da aufgrund der übereinstimmenden Expressionsmuster von *rols6* und *rols7* in der Embryogenese von *D. pseudoobscura* und *D. melanogaster* ähnliche Regulationsmechanismen zur Genexpression möglich scheinen, wurden die putativen Promotorbereiche von GA 16675 RA und RB in einem Reporterassay in transgenen *Drosophila melanogaster*-Embryonen getestet. Dabei zeigte sich das

sowohl der zum *rols7*-Promotor als der zum *rols6*- Promotor homologe Sequenzabschnitt aus *D. pseudoobscura* in der Lage ist in *D. melanogaster*-Embryonen eine mit der *rols*-Expressionsdomäne überlappende Reporterexpression zu steuern. Dies zeigt, dass die Funktionalität der untersuchten Promotorelement konserviert ist und sich die cis- regulatorische Elemente in ihrer Lokalisation zum Gen nicht wesentlich verändert haben. Das Alignment des *D. melanogaster rols*- Gen mit dem Genom von *D. pseudoobscura* mit dem UCSC-Browser v77 with VISTA tracks identifiziert innerhalb des *rols7* und GA 16675 RA Promotorbereich mehrere konservierte Abschnitte die mehr als 10 identische Basen umfassen. Da die durchschnittliche Länge bekannter cis-regulatorischer Sequenzen ca. 14 bp beträgt und die durchschnittliche Konservierung dieser regulatorischen Sequenzen zwischen *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* 10 bp beträgt, sind solche Sequenzblöcke mögliche Kandidaten für cis-regulatorische Elemente (Richards et al., 2005).

Für den *rols7*-Promotor konnte mit Hilfe von zPicture und rVista ein Alignment der Sequenz von *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* durchgeführt werden, bei dem unter Berücksichtigung von bekannten TF-Bindestellen für Insekten- und Vertebratenfaktoren 11 konservierte TF-Bindestellen identifiziert wurden; die alignnten Bereichen stimmen mit den durch den UCSC alignnten Sequenzen überein. Zu den konservierten Sequenzen gehören auch überlappende Mef2- bzw. SRF-Bindestellen (s. Einleitung und Punkt 5.5.1). Bei einer weiteren konservierten Transkriptionsfaktorbindestelle handelt es sich um eine Bindestelle für den Faktor NRF-1. Dessen *Drosophila*- Homolog Erect Wing ist an der adulten Myogenese von *D. melanogaster* beteiligt (DeSimone and White, 1993); ein Nachweis für eine Funktion in der embryonalen Myogenese konnte jedoch nicht erbracht werden. Weitere konservierte TF-Bindestellen binden Faktoren für deren *Drosophila*-Homologe (z.B. Cryptocephal oder Kayak) bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung an der Myogenese vorliegen. Zur Beurteilung ob die so identifizierten konservierten Sequenzen tatsächlich auf die Konservierung für die *rols7*-Regulation essentieller Transkriptionsfaktorbindestellen zurückzuführen sind ist ein Sequenzvergleich mit weiteren *Drosophila*- Arten sinnvoll, um Bindestellen zu identifizieren, die über eine breiteres evolutionäre Spektrum konserviert sind (Phylogenetic shadowing, Boffelli et al., 2003). Die Sequenzen weiterer bisher teilweise veröffentlichter *Drosophila*-Genome haben sich jedoch als ungeeignet

erwiesen, da *rols* bisher noch außerhalb des sequenzierten Bereich liegt (*D. mojavensis*) oder die Art so nah mit *D. melanogaster* verwand ist, dass eine fast 100% Sequenzkonservierung vorliegt (*D. simulans*, *D. yakuba*) (NCBI BLAST, BLAST 2.2.6)

Im Falle des *rols6*-Promotors konnte trotz der experimentell gezeigten Konservierung der Funktion kein erfolgreiches Alignment mit zPicture und rVista in der essentiellen Region durchgeführt werden. Auch das Alignment des gesamten genomischen Bereichs des *rols*-Gens mit dem UCSC Genome Browser v77 with VISTA tracks zeigt, dass die Konservierung auf Sequenzebene im Bereich der Enhancer für das Entoderm und die Malphigie-Gefäße relativ gering ist und keine konservierten Sequenzblöcke mit mehr als 10 bp identifiziert werden. Die funktionelle Konservierung von Enhancer-Elementen bei gleichzeitiger Divergenz der Sequenz wurde bereits mehrfach bei dem Vergleich cis-regulatorischer Sequenzen sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten beschrieben und z.B. von Ludwig et al., 1998 am Beispiel des Enhancers für den zweiten Streifen der *eve*- Expression beschrieben (s. Einleitung). Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist das Modell der stabilisierenden Selektion, welches besagt dass Mutationen im Enhancer angehäuft werden können, solange das Expressionsmuster des Gens konstant bleibt. Dieses Modell wurde anhand des Sequenzvergleichs hochmodularer Enhancer entwickelt und setzt eine gewisse Toleranz des gesamten Enhancers für Mutationen in einzelnen Bindestellen voraus. Ob Enhancer die nicht modular aufgebaut sind ein ähnliches Verhalten aufweisen ist bisher nicht geklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es Enhancer gibt die eine deutlich geringere Mutationsrate aufweisen als andere Enhancer, dies spricht dafür, dass es Enhancer gibt, die sich nicht nach dem Modell der stabilisierenden Evolution verhalten. Ein Beispiel hierfür ist der herzspezifische Enhancer des *Dmef2*-Gens bei *D. melanogaster* und der homologe Enhancer von *C. elegans* (Ruvinsky and Ruvkun, 2003). Obwohl es im Falle des *rols6*-Promotors keinen Hinweis auf einen modularen Aufbau der Enhancer- Elemente gibt, scheint es sich um einen Promotor zu handeln der das Modell der stabilisierenden Selektion untermauert, da gezeigt werden konnte, dass trotz sehr geringer Konservierung der funktionalen Elemente die regulative Funktion des Enhancers erhalten geblieben ist. Auffallend ist, dass die Expressionshöhe des Reportergens der *D. pseudoobscura*-Konstrukte in den transgenen *D. melanogaster*-Embryonen relativ niedrig ist und deutlich unter der

Expressionshöhe der entsprechenden *D. melanogaster*-Konstrukte liegt. Ein ähnliches Verhalten von Reportergenkonstrukten anderer *Drosophiliden*-Arten in *D. melanogaster*-Embryonen wurde in ähnlichen Untersuchungsansätzen z.B. beim Vergleich des *sex lethal*-Promotors von *D. melanogaster* und *D. virilis* (Jinks et al., 2003) beobachtet. Vermutlich entspricht der aus *D. pseudoobscura* stammende Cis-Regulator nicht mehr dem idealen Consensus des aus *D. melanogaster* stammenden Trans-Regulator was zu einer niedrigeren Affinität des Faktors zum Cis-Regulator führt; dies entspricht in den ersten Ansätzen dem Phänomen der Co-Evolution von cis-regulativem DNA-Element und transregulatorischem Faktor. Bei einer weiteren Auseinanderentwicklung der Genome kann dies dazu führen, dass der transregulative Faktor nicht mehr in der Lage ist die entsprechende cis-regulativen Sequenzen aus einem evolutionär weit entfernten Genom zu erkennen (s. Einleitung Punkt 1.7).

Im Gegensatz dazu weicht die transkriptionelle Aktivität des *D. pseudoobscura rols7*-Promotors von diesem generell beschriebenen Muster ab und steuert in transgenen *D. melanogaster*-Embryonen eine Reportergenaktivität die der Aktivität des entsprechenden Abschnitts aus *D. melanogaster* nicht nur entspricht, sondern sogar deutlich übersteigt. Dies deutet daraufhin, dass ein Element des aus *D. pseudoobscura* stammenden Promotors eine erhöhte Affinität zu dem an ihn bindenden *D. melanogaster* Faktor erworben hat.

5.3 An der Regulation von *rols7* sind keine bekannten myogenese-relevanten Transkriptionsfaktoren beteiligt

Um die Regulation von *rols* zu entschlüsseln und in eine Hierarchie von spezifisch in der Myogenese aktivierten Genen einordnen zu können ist es wichtig die trans-regulatorische Faktoren die für die Aktivierung dieses Gens notwendig sind zu identifizieren. Einem solchen Faktor würde in der Myogenese eine Schlüsselstellung zu kommen, da ohne die Aktivierung der *rols7*-Transkription keine Zellfusion stattfinden kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass ein solcher Faktor neben der Transkription von *rols7* noch die Transkription von weiteren myogenese-relevanten Genen wie z.B. *duf* und *schizo* steuert, die im gleichen Zelltypus aktiviert werden (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strünkelnberg et al., 2001; Chen et al., 2003). Um

diese Fragestellung zu klären wurden phänotypische Analysen mutanter Embryonen von bekannten mesodermspezifischen Transkriptionsfaktoren durchgeführt, sowie die Analyse mutanter Embryonen von Genen die eine transkriptionelle Aktivität zeigen, die in etwa mit der von *rols* korrespondiert. Da aufgrund der Promotorkonstrukte nur wenige Hinweise auf reprimierende Elemente innerhalb des *rols7*-Promotors vorliegen (mit Ausnahme der mesodermalen Derivate Dorsalgefäß und eventuell FCMs) wurde auf die Analyse von Genen bzw. Transkriptionsfaktoren verzichtet, deren Expression über das Mesoderm hinausging.

5.3.1 Dmef2 wird nicht zur Aktivierung von *rols7* benötigt, ist aber an der ektopischen Expression des Reportergens im Dorsalgefäß beteiligt

Das *mef2*-Gen ist einer der wichtigsten an der Mesodermentwicklung von *D. melanogaster* beteiligten Transkriptionsfaktoren. Der Ausfall der Genfunktion führt zu schweren Entwicklungsstörungen verschiedener mesodermaler Derivate. Davon betroffen ist auch die Myoblastenfusion (Bour et al., 1995). Dieser Faktor gehört zur Familie der MADS-Box Proteine für die im *rols7*-Promotor eine auch bei *D. pseudoobscura* in der Core-Sequenz konservierte Bindestelle vorhanden ist. Identifiziert wurde die Bindesequenz für diesen Faktor durch die Analyse von Mef2-Bindestellen in muskelspezifischen Enhancern von Vertebraten bei den Mef2 ebenfalls eine zentrale Rolle in der Myogenese hat und z.B. die Expression von MyoD und Myogenin induziert (Kaushal, 1994). Da das *Drosophila*-Protein in der Lage ist an Vertebraten-Enhancer zu binden (Lilly et al., 1994), ist von einer ähnlichen Bindesequenz bei *D. melanogaster* auszugehen. Obwohl eine Mutation von *dmef2* zu einem ähnlichen Defekt führt, wie eine *rols*- Mutation, ist die Expression von *Rols7* in *dmef2*-mutanten Embryonen nicht betroffen (Menon und Chia, 2001). Bei dem einzigen weiteren bekannten Mitglied dieser Familie bei *D. melanogaster* handelt es sich um den Transkriptionsfaktor *blistered*, der jedoch nicht mesodermal exprimiert wird. Kreuzt man das RPL-Promotorkonstrukt in *mef2*-Mutanten fällt auf, dass die Reporterexpression im Dorsalgefäß verschwindet. Daraus lässt sich schließen, dass die im Dorsalgefäß beobachtete Reporterexpression auf eine durch Dmef2 vermittelte Aktivierung des Reporters zurückzuführen ist; dabei erscheint es plausibel, dass die Bindung des Faktors an die vorhergesagte Mef2-Bindestelle erfolgt. Somit ist diese Bindestelle prinzipiell noch

funktional. Da *rols7* jedoch nicht im Dorsalgefäß transkribiert wird, ist anzunehmen, dass die Bindung von Mef2 an den vollständigen *rols7* Promotor durch Silencer-Elemente verhindert wird, die durch die Reportergenkonstrukte nicht mehr erfasst werden. Vergleicht man hiermit die Expression des Konstrukts OETSBpseudo aus *Drosophila pseudoobscura*, ist zu beobachten, dass hier keine Reportergenexpression mehr im Dorsalgefäß nachweisbar ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die *D. pseudoobscura* Mef2-Box im Gegensatz zur Mef2-Box bei *D. melanogaster* trotz der Konservierung in der Core-Sequenz den Faktor Mef2 nicht mehr binden kann.

5.3.2 Es liegen keine Hinweise darauf vor, dass Mitglieder der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *rols7* beteiligt sind

Im Zuge eines mit dem β 3-Tubulin-Antikörper durchgeführten Screens einer Kollektion von EMS-Mutanten wurden mehrere Allele des Gens *pointed* identifiziert die einen Fusionsphänotyp aufweisen (Holz, unveröffentlicht).

Pointed gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren (Klämbt, 1993; s. Punkt 5.1.4) und ist das *D. melanogaster*-Homolog von ETS1 und ETS2 bei Vertebraten und von Lin1 bei *C.elegans*. ETS-Faktoren werden meist über den MAP- Kinase Signalweg reguliert. Neben der für die ETS-Faktoren charakteristische ETS-Domäne die an der DNA-Bindung beteiligt ist, findet man bei Pointed und seinen Homologen die Pointed-Box die im Falle von ETS1 und ETS2 als Docking Site für die MAP-Kinase Erk2 dient. Die Bindung von Erk2 an die Pointed-Box ist für die Funktion dieser Proteine als Transaktivatoren essentiell (Seidel et al., 2002).

Im Vertebratenmodell konnte gezeigt werden, dass ETS-Faktoren auch an der Determination des Mesoderms bzw. der Muskulatur beteiligt sind. So ist z.B. ein ETS-SRF (Serum Response Factor) an der Regulation von Xegr und somit an der frühen Induktion des Mesoderm bei *Xenopus* beteiligt (Panitz et al., 1998).

Der Faktor PEA3 ist zusammen mit Mef2 an der Regeneration adulter Muskeln und im Zuge dieses Prozesses auch an der Fusion von Myoblasten beteiligt (Taylor et al., 1997). Außerdem ist PEA3 in der Lage mit den bHLH-Faktoren der MyoD-Familie zu interagieren (Arnold und Winter, 1998).

Der bei vier *pointed*-Allelen beobachtete Fusionsphänotyp und die mit Hilfe von TF-Search identifizierte ETS-Bindestelle innerhalb des putativen *rols*-Promotor

(beruhend auf dem Konstrukt ROPOH) lieferten Indizien für eine Funktion von Pointed bei der *rols*-Regulation. Dies wurde experimentell getestet. Parallel wurde eine mögliche Beteiligung des Pointed- Antagonisten Yan an der *rols7*-Regulation überprüft. Obwohl beide Faktoren mesodermal exprimiert werden und neben Zielen des Ras/MAPK-Signalwegs auch Ziele des Notch-Signalwegs sind (s. Punkt 5.1.4) wurden keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der *rols7*-Transkription bzw. der Myoblastenfusion von einem der beiden Faktoren entdeckt. Das Fehlen bzw. das vermehrte Auftreten von Muskeln kann auf eine Fehldetermination einzelner Gründerzellen zurückzuführen sein. Die Deletion der ETS-Box im Promotor hat ebenfalls keinen Einfluss auf die gewebespezifische Expression des Reportergens (s. Punkt 5.1.4). Allerdings ist das Transkriptionsniveau des verkürzten OETSB-Konstrukts im Vergleich zu dem Transkriptionsniveau von ROPOH deutlich herabgesetzt, so dass die Beteiligung eines anderen ETS-Faktor als Co-Aktivator an der Regulation von *rols* nicht ausgeschlossen werden kann (s. Punkt 5.1.4). Mögliche Interaktionspartner könnten hier Faktoren sein, die zur Gruppe der bHLH-Faktoren gehören oder der mit den Serum Response Faktoren verwandte Faktor Mef2 sein. Für diese Faktoren wurde wie bereits beschrieben Interaktionen mit ETS-Faktoren in der Myogenese von Vertebraten nachgewiesen. Aufgrund der noch erfolgenden *rols7*-Transkription in *dmef2* Nullmutanten ist eine Beteiligung dieses Faktors an der *rols7*-Regulation unwahrscheinlich.

Der bei den aus der EMS-Mutagenese hervorgegangene *pointed*-Allelen beobachtete Fusionsphänotyp ist vermutlich auf eine weitere durch das Mutagen hervorgerufenen Mutationen erklärbar. Bei *pnt*^{3D2-26} liegt diese die Mutation im Bereich 66B8-B10 (Susanne Berger, Diplomarbeit 2005)

5.3.3 Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Lameduck hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von *rols7* in den Founderzellen

Neben Mef2 handelt es sich bei Lameduck bisher um den einzigen Transkriptionsfaktor, bei dem eine Beteiligung an der Regulation von fusionsrelevanten Genen in der Myogenese von *D. melanogaster* nachgewiesen werden konnte. Lameduck gehört zu der Familie der Gli-Zinkfingertranskriptionsfaktoren zu der z.B. auch Gli1 und Gli2 bei Vertebraten und Cubitus interruptus bei *Drosophila* gehört.

Lameduck wird hauptsächlich in den fusionskompetenten Myoblasten exprimiert, allerdings kann eine Expression von Lameduck auf einem niedrigen Niveau in den Founderzellen nicht ausgeschlossen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Lameduck für die Expression von Sns und Dmef2 in den fusionskompetenten Zellen essentiell ist, die Expression von Dmef2 in den Founderzellen ist nicht beeinflusst (Duan et al., 2001).

In *lameduck*-Mutanten ist auch in späten Stadien noch eine deutliche Expression des Rols7-Proteins in den Founderzellen bzw. den mononukleären Minimuskeln nachweisbar. Es kann auch keine zusätzliche Expression von Rols7 in den FCMs beobachtet werden, was für eine negative Regulation von *rols7* in den FCMs sprechen würde. Dass das Protein in den Mutanten z.T. noch in relativ großen Mengen in den Minimuskeln nachweisbar ist, hängt vermutlich mit dem Ausbleiben der Membranfusion selbst zusammen, da dieses Phänomen bei zahlreichen Fusionsmutanten beobachtet werden kann (s. Punkt 5.4.2).

5.3.4 Eine Beteiligung verschiedener laut BDGP *in situ* mesodermal exprimierter Transkriptionsfaktoren bzw. Proteine bisher ungeklärter Funktion an der Regulation von *rols7* im somatischen Mesoderm konnte ausgeschlossen werden

Zur Identifikation von bisher unbekannten Faktoren, die an der Regulation von fusionsrelevanten Genen- insbesondere *rolling pebbles*- beteiligt sind, wurde die BDGP *in situ*-Datenbank nach Genen durchsucht, die in den Stadien 10-13 im somatischen und/oder viszerale Mesoderm exprimiert werden. Anschließend wurden Defizienzen die Gene umfassten, die für Transkriptionsfaktoren oder Proteine unbekannter Funktion codieren, auf das Auftreten von Fusionsphänotypen untersucht und die korrekte *rols7*-Expression im somatischen und viszerale Mesoderm durch *in situ*-Hybridisierungen getestet. So konnten z.B. durch die Überprüfung von Genexpressionsmustern bei BDGP *in situ* weitere mesodermal exprimierte Zinkfingertranskriptionsfaktoren identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um den ebenfalls zur Gli-Familie gehörenden und mit Lameduck verwandte Faktor Sugarbabe (CG3850) (Aruga, 2004) und um Goliath und Jing. Laut Artero et al. 2003 wird Goliath in den FCMs exprimiert und wie Lameduck durch Notch aktiviert

(Duan et al., 2001) und somit kann Goliath als *rols7*-aktivierender Faktor ausgeschlossen werden.

Defizienzen, welche die Zinkfingerfaktoren Jing und Sugarbabe deletieren, zeigen keine Hinweise auf die Beteiligung dieser Faktoren an der Regulation von *rols7*. Ähnliches gilt für alle weiteren Defizienzen welche z.T. Transkriptionsfaktoren bzw. Faktoren unbekannter Funktion mit mesodermaler Expression deletieren (s. Punkt 4.6.3 und 4.6.4).

Eine Ausnahme bildet hierbei die Defizienz Df(2R)stan1, welches das Gen für die gewebespezifisch exprimierte RNA-Polymerase II-Untereinheit Rpb5, deletiert. Hier konnte eine spezifische Störung in der Expression von *rols7* in der viszeralen Muskulatur nachgewiesen werden, obwohl dieses Gewebe mit Founder- und FCM-Zellen in mutanten Embryonen angelegt wird. Da Defizienz besitzt die Bruchpunkte 46D07-09 und 47F15-16 und deletiert neben *rpb5* zahlreiche weitere Gene. Zur Überprüfung, ob tatsächlich Rpb5 eine essentielle Funktion bei der Aktivierung von *rols7*, hat muss der Bereich der Defizienz, welcher für die Störung der *rols7* Transkription in der viszeralen Muskulatur relevant ist, weiter eingegrenzt werden.

5.4 Analyse und evolutionärer Vergleich der *rols7*-Promotorregion deuten auf einen nicht-modularen, kurzen Promotor hin, an dessen spezifischen Regulation möglicherweise generelle Transkriptionsfaktoren beteiligt sind

Die Analyse der cis- und trans-regulatorische Elemente die an der Transkriptionsregulation des *rols*-Gens beteiligt sind, zeigt dass es sich bei dem *rols7*-Promotor um einen ungewöhnlich strukturierten Promotor handelt, an dessen Regulation keiner der bisher bekannten myogenese-relevanten bzw. mesodermal exprimierten Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. Die zeit- und gewebespezifische Expression wird fast vollständig über den Leader des Gens gesteuert. Innerhalb dieses Bereiches werden durch TFSearch Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktorbindestellen vorhergesagt, die bei Vergleich dieser DNA-Abschnitte zwischen *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* als konservierte Bindestellen erkannt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Mef2-Bindestelle, die jedoch gleichzeitig zeigt, dass eine Analyse der Konservierung von Promotorabschnitten

zwischen zwei Spezies zwar hilfreich für die Identifikation konservierter cis-regulatorischer Elemente und der an sie bindenden transregulatorischen Faktoren sein kann, jedoch nicht zwangsläufig zu einem eindeutigen Ergebnis führen muss. So ist die cis-regulatorische Mef2-Bindestelle zwar auf Sequenzebene eindeutig konserviert, trotzdem wird der trans-regulatorische Faktor Dmef2 für die Initiation der Transkription von *ro/s7* nicht benötigt. Ob diese Sequenz nun keine regulatorische Funktion mehr hat, kann anhand der durchgeführten Untersuchungsansätze nicht geklärt werden. Möglich wäre, dass ein bisher unbekannter Faktor an ähnliche DNA-Sequenzen wie der Faktor Mef2 bindet und so die *ro/s*- Expression steuert. Dies gilt auch für die weiteren konservierten DNA-Abschnitte wie z.B. die Erect wing oder Cryptocephal-Bindestelle. Die Expression eines solchen Transkriptionsfaktor sollte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Mesoderm beschränkt sein, da die Daten aus den Promotorkonstrukt-Analysen nicht darauf hindeuten, dass die getesteten Sequenzen durch einen Faktor gebunden werden, der eine Genexpression außerhalb des Mesoderms steuert. Sollte der DNA bindende Transregulator dennoch ein breiteres Expressionsspektrum aufweisen, ist die Involvierung mindestens eines weiteren Transkriptionsfaktors bzw. eines Kofaktors zu fordern, der die Genexpression auf das somatische Mesoderm beschränkt. Ein Modell bei dem mehr als ein Transkriptionsfaktor für die Transkriptionsinitiation des *ro/s7*-Gens benötigt wird könnte auch eine Erklärung sein warum es nicht gelang einen mit dem *ro/s7*-Promotor interagierendes Protein im Yeast One Hybrid Screen zu identifizieren. Bei diesem Screen ist es durch die Transformation der Hefezellen mit den Plasmiden einer cDNA-Bank nahezu unmöglich, Faktoren die Heterodimere zur DNA-Bindung bilden, zu isolieren, da eine gleichzeitige Transformation einer Hefezelle mit cDNAs, die für die Interaktionspartner codieren extrem unwahrscheinlich ist.

Da jeder Founder/Precursor durch ein distinktes Set von Transkriptionsfaktoren spezifiziert wird, wäre eine weitere Möglichkeit, dass die *ro/s7*-Transkription in jedem Founder/Precursor durch das jeweilige Genset aktiviert wird. Dies ist jedoch aufgrund der geringe Größe des Gesamtpromotors nicht zu erwarten, da die Spezifikation der Founder/Precursorzellen über neun, in unterschiedlichen Kombinationen, exprimierte Transkriptionsfaktoren erfolgt (Review: Abmayr et al., 2004). Eine Regulation von *ro/s7* durch diese Faktoren würde einen umfangreichen und hochmodularen Gesamtpromotor mit zahlreichen unterschiedlichen Enhancer, wie z.B. bei den Promotoren zur Regulation der Segmentierungsgene, erfordern. Im Gegensatz dazu

ist bei relativ kurzen Promotoren oft eine Beteiligung von den generelle Transkriptionsfaktoren an der spezifischen Regulation der Transkription z.B. durch gewebespezifische TAFs gezeigt worden. Typisch hierfür sind die kurzen Promotoren in der Spermiogenese von *D. melanogaster* die von gewebespezifischen TAFs wie Can, Mia und Rya reguliert werden (Hiller et al., 2004). Möglicherweise sind auch an der spezifischen Expression von *rols7* generelle Transkriptionsfaktoren beteiligt, sollte z.B. die Deletion von Rpb5 der Grund für das Fehlen der viszeralen *rols7*-Expression bei homozygoten Embryonen der Defizienz sein, würde dies für eine durch generelle Transkriptionsfaktoren modulierte *rols7*-Expression sprechen. Dafür das der *rols7*-Core-Promotor nicht zwangsläufig durch den Standard-PIC erkannt wird spricht auch der ungewöhnliche Aufbau des Core-Promotors ohne bekannte cis-Elemente.

5.5 Der Translationsinitiationsfaktor eIF3-S10 wird während der Myogenese mesodermal exprimiert und ist dort möglicherweise an Prozessen wie mRNA-Transport und Translationsinitiation beteiligt

Im Rahmen eines zur Identifikation von transregulatorischen Faktoren durchgeführten Binding Site Screen wurde als ein an den *rols7*-Promotorbereich bindendes Protein der Faktor eIF3-S10 isoliert. Bei eIF3-S10 handelt es sich um das *D. melanogaster*-Homolog des Vertebraten-Translationsinitiationsfaktors eIF3-S10 der in zahlreichen unterschiedlichen Systemen identifiziert wurde und auch unter den Bezeichnungen eIF3 Subunit Theta, p170, p180, p167, p150/p170 und Centrosomin a und b bekannt ist. Aufgrund der Isolation des Proteins mit dem in die Translationinitiation involvierten Multienzymkomplex eIF3 wird eIF3-S10 zu den Translationsinitiationsfaktoren gerechnet. Es wurde gezeigt, dass eIF3-S10 mit weiteren Untereinheiten von eIF3 (p44 und p116) und mit eIF4B (Methot et al., 1996; Methot et al., 1997; Block et al., 1998) sowie RNA interagiert (Buratti et al., 1998). eIF3 bindet bei der Transkriptionsinitiation an die S40 Untereinheit der Ribosomen und ist in die Bindung der Methionyl-tRNAi und der mRNA involviert. Trotz dieser Assoziation von eIF3-S10 mit dem eIF3-Komplex wurde gezeigt, dass eIF3-S10 nicht essentiell für die Funktion von eIF3 ist (Chaudhuri et al., 1997). Da eIF3-S10 anscheinend nicht prinzipiell für die Translationinitiation benötigt wird, vermutet man,

dass eIF3-S10 nur an der Translation eines Subsets von mRNAs beteiligt ist. Deren Proteinprodukte haben möglicherweise einen Einfluss auf die Malignität bestimmter Tumore (Dong et al., 2004), da erhöhte eIF3-S10 Level z.B. bei Lungenkrebs, Brustkrebs und verschiedenen anderen Tumoren festgestellt wurden (Pincheira et al., 2001; Lin et al., 2001). Die Klassifizierung von eIF3-S10 als Translationsinitiationsfaktor lässt eine Beteiligung dieses Faktors an der Transkriptionsinitiation von *rols7* eher unwahrscheinlich erscheinen. Die bisher bekannten Daten zur Proteinverteilung und zum Proteinaufbau von eIF3-S10 sprechen allerdings dafür, dass sich die Funktion von eIF3-S10 nicht auf die Translationsinitiation beschränkt. So wurde eIF3-S10 nicht nur im Komplex mit eIF3 identifiziert, sondern in Assoziation mit zahlreichen anderen zellulären Komponenten. Das Maus-Homolog Centrosomin A wurde z.B. aufgrund seiner permanenten Assoziation mit den Centrosomen identifiziert, die Splicevariante Centrosomin B kann im Kern nachgewiesen werden (Petzelt et al., 1997). In Lungenkrebszellen wurde das Protein aus der Membranfraktion isoliert (Pincheira et al., 2001); weiterführend wurde eine Assoziation von ca. 20% des Proteins mit Plasmamembran und der Membran des endoplasmatischen Reticulums nachgewiesen (Pincheira et al., 2001). Bei apoptotischen Zellen ist eIF3-S10 an der Plasmamembranoberfläche lokalisiert und wird für die Phagocytose dieser Zellen durch Makrophagen benötigt (Nakai et al., 2005). Neben dem IF3-Komplex, den Centrosomen und der Membranfraktion wurde eIF3-S10 in Assoziation mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten isoliert (Shanina et al., 2001; Lin et al., 2001) und hat möglicherweise eine Adapterfunktion zwischen Zytoskelett und Translationsinitiationsapparat (Lin et al., 2001). Auch das *Drosophila*-Homolog dieses Faktors wurde zusammen mit Mikrotubuli bzw., Mikrofilamenten isoliert und wird aus diesem Grund auch als MMAP140 (Microfilament/Microtubule Associated Protein 140) bezeichnet (Sisson et al., 2001). Die Assoziation des eIF3-S10-Proteins mit zahlreichen Cytoskelettkomponenten könnte neben einer Funktion dieses Faktors als Translationsinitiationsfaktors auch auf Funktion dieses Faktors bei dem Transport von mRNAs hindeuten.

Da der Faktor eIF3-S10 im Binding Site Screen mit einer aus dem Leader stammenden Sequenz isoliert wurde, besteht die Möglichkeit, dass dieser Faktor nicht mit der cis-regulatorischen Sequenz auf DNA-Ebene interagiert, sondern an den Leader der mRNA bindet und aufgrund der Interaktion mit einzelsträngiger DNA

isoliert wurde. Durch die nachgewiesenen ungleichmäßigen Verteilung der *rols7* mRNA und deren Lokalisation in Membrannähe, sowie der verzögerten Translation der *rols7*-mRNA (s. Punkt 4.4.5) eröffnet dies die Möglichkeit, dass eIF3-S10 an Mechanismen wie der Translationsinitiation und der Transkriptlokalisation der *rols7*-mRNA beteiligt ist. Eine Lokalisation der mRNA ist z.B. typisch für Transkripte die für synaptische Proteine codieren. Dieser Mechanismus gewährleistet eine hohe Flexibilität des synaptischen Proteoms (Review: Palacios and StJohnston, 2001). Aufgrund des synapsenähnlichen Aufbau des Präfusionskomplex mit den an der Membran lokalisierten elektronendichten Plaques und dem Nachweis des Rols-Homologs TANC in Assoziation mit der postsynaptischen Membran besteht die Möglichkeit (Suzuki et al., 2005), dass sich das Transkript ähnlich wie Transkripte von synaptischen Proteinen verhält und zunächst an die Membran transportiert wird, um direkt an der Membran translatiert zu werden. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass das Protein im Verhältnis zu mRNA-Transkription etwas verzögert exprimiert wird, da eine Translationskontrolle für lokalisierte Proteine typisch ist um eine verfrühte Expression zu vermeiden.

In diesem Fall wäre eine mögliche Funktion von eIF3-S10 der Transport der *rols7*-mRNA zum Zielort innerhalb der Zelle und die Translationsrepression der mRNA bis zum Erreichen des Zielkompartiments. Eine Funktion für den Transport von mRNAs durch Translationsinitiationsfaktoren aus dem Kern ins Zytoplasma wird z.B. für den Translationsinitiationsfaktor eIF4E postuliert (Strudwick et al., 2002). Bei diesem Faktor handelt es sich um einen der ersten Translationsinitiationsfaktoren deren Lokalisation im Nukleus bestätigt wurde; eine nukleäre Lokalisation wurde mittlerweile auch für andere Translationsinitiationsfaktoren wie eIF3e verifiziert. eIF3-S10 konnte bisher noch nicht im Nukleus nachgewiesen werden, das Protein besitzt jedoch eine NLS und wird durch NucPred und Prosite mit hoher Wahrscheinlichkeit im Kern vorhergesagt. Experimentell konnte gezeigt werden, dass zumindest Fragmente des Proteins in den Nukleus transportiert werden (Chudinova et al., 2004). Da eIF3-S10 sowohl in Verbindung mit Mikrotubuli als auch an der Plasmamembran nachgewiesen werden kann, erscheint eine Beteiligung von eIF3-S10 an Transportvorgänge die zur Membran gerichtet sind nicht unwahrscheinlich.

Im Falle der Involvierung von eIF3-S10 in die Regulation der Genexpression bzw. in den Transport der mRNA von *rols7* sollten experimentell eine Expression von eIF3-S10 in mit der Rols- Expression überlappenden Geweben nachgewiesen werden. Mit

Hilfe von *elf3-S10 in situ* Hybridisierungen und einer rP298-Färbung konnte gezeigt werden, dass *elf3-S10* zwar zunächst ubiquitär exprimiert wird, um ab Stadium 10 vermehrt in AMG und PMG und der somatischen Muskulatur nachweisbar zu sein. Das Vorhandensein des Proteins in den gleichen Zellen stellt eine grundlegende Voraussetzung für eine Beteiligung von eIF3-S10 an der Rols7-Regulation dar, allerdings scheint eIF3-S10 in den FCMs ebenso exprimiert zu werden wie in den Founderzellen. Die Färbungen mit einem gegen das humane p170 gerichteten Antikörper (Shanina et al., 2001) weisen ein Protein in übereinstimmenden Geweben nach. Zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung kann das Protein centrosomal nachgewiesen werden. Der Beweis, dass es sich bei dem dedektierten Protein tatsächlich um *Drosophila* eIF3-S10 handelt, konnte noch nicht endgültig erbracht werden, es erscheint jedoch aufgrund der hohen Konservierung des Proteins, der Lokalisation des Proteins in den Centrosomen früher Embryonalstadien und der Übereinstimmung der beobachteten Proteinexpressionsdomäne mit den eIF3-S10 transkribierenden Geweben wahrscheinlich.

Sind Proteine in die Regulation der Expression eines bestimmten Gens beteiligt, ist häufig zu beobachten, dass der mutante Phänotyp des regulierenden Faktors dem des regulierten Faktors ähnelt. Um zu überprüfen, ob ein Defekt im eIF3-S10-Genlocus einen *rols7*-ähnlichen Muskelphänotyp verursacht, wurden Embryonen einer P-Elementinsertion in den *elf3-S10*-Locus auf das Auftreten mesodermaler Phänotypen hin überprüft. Die P-Element-Integration führt zu embryonaler Letalität der Embryonen, allerdings weist das somatische Mesoderm keine sichtbaren Entwicklungsstörungen auf. Da jedoch nicht klar ist, ob es sich bei der P-Element-Integration um ein Null-Allel für eIF3-S10 handelt (die Integration erfolgte in das erste Intron des Gens) kann aus dieser Beobachtung nicht geschlossen werden, dass eIF3-S10 nicht an der Muskelentwicklung beteiligt ist. Möglicherweise wird noch ein teilweise funktionsfähiges Protein gebildet, welches zwar nicht mehr die Überlebensfähigkeit des Embryos sichert, jedoch in der Lage ist eine normale Mesodermentwicklung zu steuern. Da die Integration in das Intron erfolgt ist, besteht auch die Möglichkeit, dass die embryonale Letalität der P-Element-Insertion nicht auf eine Störung der Proteinfunktion von eIF3-S10 beruht, sondern das durch die Integration ein cis-regulatorische Element zerstört wurde, welches die Transkription eines anderen essentiellen Gens steuert. Weiterhin ist bei Genen mit einer maternalen Komponente (wie bei eIF3-S10) das Protein noch bis in die späte

Embryogenese nachweisbar und zur Beobachtung von früher auftretenden Defekten ist die Herstellung eines Keimbahnklons notwendig. Sollte der Befund bestätigt werden, dass eIF3-10 mutanten Embryonen keinen Fusionsphänotyp aufweisen (z.B. durch die morphologische Analyse einer eIF3-S10 umfassenden Defizienz) würde auch dies eine Beteiligung von eIF3-S10 z.B. dem Transport der mRNA nicht endgültig ausschließen, da mehrfach gezeigt wurde das auch bei der Lokalisation von Proteinen aufgrund von mRNA-Lokalisation häufig ein zweiter Mechanismus vorliegt, der zur direkten Lokalisation des Proteins führt auch wenn dieses nicht in der korrekten cytoplasmatischen Lokalisation translatiert wurde (Review:Palacios and Johnston, 2001).

5.6 Die fusionrelevanten Proteine Rols7, Duf/Kirre und Sns sind in einem podosomen- und immunologische Synapsen- ähnlichen adhesiven Komplex (PILMAC) angeordnet, dessen Aufbau unabhängig von den meisten bekannten Komponenten der Fusionsmaschinerie erfolgt

5.6.1 Rols7, Duf/Kirre und SNS sind an der Kontaktstelle von fusionskompetenter Myoblaste mit Founder/Precursorzelle in podosomen und immunologische Synapsen ähnliche Strukturen integriert

Bei der Zellerkennung und Zelladhäsion von FCMs mit Founder/Precursorzellen handelt es sich um essentielle Schritte in der Myoblastenfusion, die eine Verschmelzung der Plasmamembranen erst ermöglichen.

Immunhistologische Nachweise von Rols7, Duf/Kirre und Sns zeigen eine ringförmige Lokalisation der Proteine an bzw. in der Membran im Bereich des Kontakts von FCMs mit Founder- bzw. Precursorzellen. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Struktur mit während der Fusionsstadien von QM-RSV-Zellen (mit einer temperatursensitiven Form des Rous Sarcoma Virus transformierte Wachtelmyoblasten) auftretenden Podosomen (Hirayama et al., 2000) wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, ob die Kontaktstelle einer FCM mit der Founder- bzw. Precursorzelle strukturell dem podosomalen Aufbau entspricht. Bei Podosomen

handelt es sich um einen „fokalen“ Zellkontakt, der in seinem Aufbau von der klassischen fokalen Adhäsion abweicht. Podosomen wurden bisher nur in Zellkultur und meist bei Zellen die von Monozyten abstammen nachgewiesen. Zusätzlich wurden sie bei Zellkulturen glatter Gefäßmuskelzellen, Endothel- und in QM-RSV-Zellen beschrieben. Die in Zellkultur nachgewiesenen Podosomen dienen der Zellmigration und der Adhäsion der Zellen an das Substrat. Relativ sicher ist auch die Beteiligung von Podosomen an der Degradation der extrazellulären Matrix, dies wurden bei Eosinophilen und glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet (Johanson et al., 2004; Burgstallen and Gimona, 2005; Review Linder and Kopp, 2005).

Typisch ist der zweigeteilte Aufbau eines Podosoms mit einem Ring aus adhäsionsvermittelnden Proteinen wie Integrine, Talin, Vinculin und Paxillin sowie einem Kern von F-Actin und aktininteragierenden bzw. aktinregulierenden Proteinen wie α -Actinin, Cortactin, Gelsolin und WASP (s. Abb.5.6.1) (Review: Linder und Kopp, 2005).

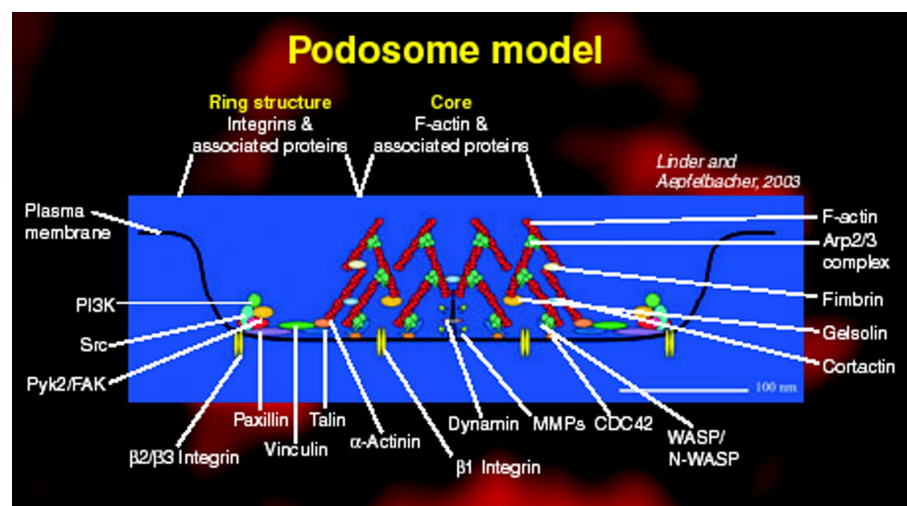


Abb. 5.6.1: schematischer Aufbau eines Podosoms mit Ring und Core in einer Vertebraenzelle (aus Linder und Kopp, 2005)

Podosomen wurden zunächst bei Zellen beschrieben die durch virale Onkogene transformiert wurden (David-Pfeuty und Singer, 1980), allerdings werden diese viral induzierten podosomal Strukturen nicht mehr als echte Podosomen angesehen, sondern werden als Invadopodien bezeichnet, die neben funktionalen Unterschieden eine deutliche Differenz in der Größe der Struktur aufweisen. So erreicht ein Invadopodium eine Größe von ca. 8 μm , ein Podosom hat einen Durchmesser von ca. 0.5-2 μm (Linder and Kopp, 2005; Buccione et al. 2004). Invadopodien entstehen vermutlich aus podosomal Vorläufern. Neben dem zweigeteilten Aufbau und der relativ konstanten Größe ist ein weiteres Merkmal von Podosomen ihre hohe

Dynamik- im Gegensatz zur fokalen Adhäsion werden Podosomen sehr schnell auf- und abgebaut (Halblebenszeit: 2-12 min).

Betrachtet man nun den Aufbau der Adhäsionsstruktur der FCMs mit Founder- bzw. Precursorzellen ist eine deutliche Übereinstimmung dieser Struktur mit einem Podosom der zweigeteilte Aufbau mit Rols7 als Komponente des Rings und F-Aktin als Kernkomponente (Abb.4.7.2 J + N). Aufgrund der Kolo-kalisation von Duf/Kirre mit Rols und Sns und der in der immunhistochemische nachweisbaren ringförmigen Lokalisation von Duf/Kirre und Sns kann als gesichert gelten, dass es sich bei diesen Proteinen ebenfalls um Ringkomponenten handelt. Im Gegensatz zu Rols7, das nur teilweise im Überlappungsbereich von Kern und Ring mit F-Aktin kolo-kalisiert, weist das aktininteragierende Protein Titin eine vollständige Kolo-kalisation mit F-Aktin im Kern auf (Abb. 4.7.2 P). Auch die initiale Größe der beobachteten Struktur von 1-2 μm stimmt mit der bei Podosomen bekannten Ausdehnung von 0.5-2 μm überein. Allerdings scheint die bei der Myogenese beobachtete Ringstruktur in der Lage zu sein sich auszudehnen (s. Abb. 4.7.1b und 4.7.2 Q), eine solche Beobachtung wurde bei Podosomen bisher nicht gemacht. Da die Myoblastenfusion ein relativ rasch ablaufender Prozess ist kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Kontaktstellen wie Podosomen eine hohe Dynamik besitzen und schnell auf- und abgebaut werden. Ein deutlicher Unterschied der adhesiven Struktur bei der Myoblastenfusion und einem Podosom ist das Fehlen des $\beta 1$ -Integrin Homologs β_{PS} -Integrin (Abb. 4.7.1 R), welches im Ring von Podosomen vorhanden ist. Somit entspricht der Aufbau des Adhäsionskomplexes zwischen FCMs und Founder/Precursorzellen nicht dem klassischen podosomal Aufbau, allerdings wurden Abweichungen in diesem Aufbau schon mehrfach beschrieben; so ist in Podosomen die die Haftung von Eosinophilen an VCAM-1-Matrix vermitteln weder Vinculin, Talin noch Paxillin vorhanden (Johanson et al. 2004). Ausgehend von einem allgemeineren Aufbau von Podosomen mit einem Kern aus F-Aktin und F-Aktin interagierenden Proteinen und einem Ring aus adhäsionsvermittelnden Proteinen (Linder and Kopp, 2005) stimmt der Adhäsionskomplex zwischen FCMs und Founder/Precursorzelle mit dem podosomal Aufbau überein. Der Ring wird hierbei von den adhäsiven Proteinen Duf/Kirre und Sns sowie den Duf-Interaktionspartner Rols7 gebildet; dieser umfasst einen Kern aus F-Aktin und F-Aktin interagierenden Molekülen (in diesem Fall Titin). Es handelt sich hierbei um den ersten Nachweis einer podosomenähnlichen, adhesiven Struktur in einem sich

entwickelnden Organismus, da Podosomen bisher nur in Zellkultur nachgewiesen wurden. Außerdem kann anhand dieser Struktur erstmals gezeigt werden, dass sich die Fähigkeit zur Bildung solcher adhäsiver Komplexe nicht auf Vertebraten beschränkt. Bisher wurde nur von dem *Drosophila*- Protein Invadolysin (Metalloprotease) beschrieben, dass es nach der Transformation in HeLa- Zellen in Invadopodien lokalisiert wird und somit in eine podosomenähnliche Struktur integriert werden kann (McHugh, 2004).

Neben dem Podosom und dem in der Myogenese beobachtete adhäsive Komplex weist auch die immunologische Synapse einen zweigeteilten Aufbau auf. Bei der Bildung der immunologischen Synapse zwischen einer T-Zelle und einer antigen-präsentierenden Zellen wird ebenfalls ein ringförmiger adhäsiver Komplex gebildet, bei dem der Ring aus Proteinen der Integrin-Familie wie LFA-1 und Talin besteht und der Kern z.B. aus T-Zell-Rezeptoren (bzw. aus MHC-Molekülen auf Seiten der antigen-präsentierenden Zellen). Der Ring trägt hier die Bezeichnung pSMAC für peripheral supra-molecular activation cluster und der Kern die Bezeichnung cSMAC für central supra-molecular activation cluster (Monks et al., 1998, Review: Donnadieu et al., 2001; Friedl and Storim, 2004). Bei der immunologischen Synapse hat man aufgrund des Zell-Zell-Kontakts eine Situation die deutliche Übereinstimmungen mit dem Kontakt von FCM- und Founderzelle in der Myogenese zeigt. Sie schafft einen engen Kontakt zwischen den Plasmamembranen und dient dem Informationsaustausch. Auch beim Kontakt von FCM- und Founderzelle muss es zur Kommunikation der Zellen kommen, da die Zellen in der Lage sein müssen den jeweils anderen Zelltyp unabhängig von der Adhäsion zu erkennen, um z.B. eine homophile Adhäsion von Duf/Kirre exprimierenden Zellen zu vermeiden. Eine zentrale Lokalisation Von F-Aktin kann auch bei der immunologischen Synapse beobachtet werden, allerdings ist die F-Aktinverteilung insgesamt dynamischer und F-Aktin ist auch häufig an der Peripherie des Komplexes zu finden (Tskvitaria-Fuller et al., 2003). Bei der sogenannten zytotoxischen immunologische Synapse konnte kein F-Aktin im Zentrum der Struktur nachgewiesen werden, interessanterweise kann es allerdings innerhalb dieser Struktur zur Fusion der beiden Plasmamembranen kommen (Stinchcombe et al., 2001b).

Insgesamt zeigt der in der Myogenese von *D. melanogaster* involvierte adhäsive Komplex sowohl Gemeinsamkeiten mit der immunologischen Synapse als auch mit dem strukturellen Aufbau eines Podosoms, ohne dabei vollständig mit einer der

beiden Strukturen überein zu stimmen. Allen gemeinsam ist die Ausbildung eines ringförmigen adhäsiven Komplex mit einer peripheren Lokalisation der adhäsiven Komponenten und einer zentralen Lokalisation von Proteinen, die eine Funktion in der Signalübertragung und/oder dem Rearrangement des Cytoskeletts haben (Review: Dustin und Cooper, 2000; Kopp und Linder, 2005). Es wurde bereits die Hypothese erstellt, dass Podosomen, vergleichbar mit der immunologischen Synapse, ebenfalls eine Art von Synapse darstellen, die zur lokalisierten Sekretion von Gewebe- bzw. ECM-abbauenden Molekülen in der Lage sind (Trasher, 2002; Stinchcombe et al., 2001a). Auch die vermutlich exocytotische Auflösung der elektronendichten Vesikel des Präfusionskomplexes zu den elektronendichten Plaques kann als eine lokal begrenzte Sekretion angesehen werden; somit kann dieser Vorgang mit an einer Synapse ablaufenden Prozessen verglichen werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten des adhäsiven Komplexes in der Myogenese von *D. melanogaster* mit dem Podosom und der immunologischen Synapse erscheint die Berücksichtigung dieser Übereinstimmung bei der Benennung dieser Struktur mit PILMAC für Podosome and Immunological synapse Like Myogenic Adhensive Complex sinnvoll.

Die Möglichkeit, dass es sich bei der immunologischen Synapse, dem Podosom und dem PILMAC um Varianten eines grundlegenden von Metazoen entwickelten adhäsiven Komplexes handelt, kann in Betracht gezogen werden. Entscheidend ist die offensichtliche Konservierung des prinzipiellen Aufbau z.B. eines Podosoms mit F-Actin und F-Actin interagierenden Proteinen im Kern der Struktur und einem Ring aus adhäsiven und adhäsionsvermittelten Proteinen wie Integrinen, Vinculin und Talin bei Vertebraten und Duf/Kirre mit dem Interaktionspartner Rols7 und Sns bei *D. melanogaster* im Ring des PILMACs. Im Verlauf der Evolution scheint es hier ein Austausch von Proteinen ähnlicher Funktion stattgefunden zu haben, der die Funktion einer bestimmten Struktur aufrecht erhält aber deren Proteinkomposition ändert (ein Phänomen, dass an die beschriebene Co-Evolution von cis- und transregulatorischen Faktoren erinnert mit dem einzigen Unterschied, dass es sich hierbei nicht um Protein- DNA Interaktionen, sondern um Protein-Protein Interaktionen handelt). Dies gilt prinzipiell auch für die Komposition der immunologischen Synapse. Möglicherweise kann die neuronale Synapse (so werden z.B. zahlreiche der in die Myogenese involvierten Faktoren ebenfalls in der Neurogenese genutzt und homologe Proteine von Duf/Kirre und Rols sind bei

anderen Taxa wie Nematoden und Vertebraten (Shen et al., 2004, Suzuki et al., 2005) im Bereich der Synapse lokalisiert) ebenfalls zu diesen Komplexen gezählt werden.

Die Beobachtung, dass am Aufbau des PILMACs die für die Fusion relevanten Komponenten Duf und Sns beteiligt sind zeigt, dass es sich hierbei um eine essentielle Struktur in diesem Prozess handelt, der unter anderem der Adhäsion von FCM und Founder/Precursorzelle dient. Die Integration von Rols7 und die Lokalisation von später in der Fusion benötigten Proteinen wie Schizo/Loner und Drac über Duf/Kirre zeigen jedoch, dass die Funktion des Komplexes über die Adhäsionsvermittlung hinausgeht. Dies gilt auch für die immunologische Synapse und das Podosom, die wie bereits beschrieben z.B. zusätzlich der Zell-Zell-Kommunikation oder der Degradation von ECM-Komponenten dienen. Obwohl eine direkte Involvierung in die Fusion von Plasmamembranen bisher erst für die zytotoxische immunologische Synapse beschrieben wurde, ist für zahlreiche Komponenten die am Aufbau von immunologischer Synapse und/oder Podosom beteiligt sind die Beteiligung an Zellfusionsvorgängen bekannt. Aufgrund dessen erlaubt die Analyse der Funktion dieser Komponenten beim Aufbau von Podosoms und immunologischer Synapse, sowie deren Rolle bei anderen Fusionsprozessen, möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion dieser Komponenten (bzw. homologer und funktionsanaloger Komponenten) beim Aufbau des PILMACs und in der Myoblastenfusion.

Bei einer dieser Komponenten handelt es sich um $\beta 1$ -Integrin (s. Abb. 5.6.1). Dieses Molekül wird für die Myoblastenfusion in der Myogenese von Mäusen benötigt (Schwander et al., 2003). Auch bei QM-RVS-Zellen wurde $\beta 1$ -Integrin zeitnah zur Myoblastenfusion dedektiert. $\beta 1$ -Integrin ist hier in Podosomen organisiert, wurde jedoch nicht an der Kontaktstelle von Muskelfaser und Myoblaste nachgewiesen. (Hirayama et al., 2000). $\beta 1$ -Integrin und $\beta 2$ -Integrin sind auch an den adhäsiven Vorgängen beteiligt, die zur Bildung von FBGCs (Foreign Body Giant Cell) durch die Fusion von Makrophagen führt, wobei $\beta 2$ -Integrin für diesen Vorgang essentiell ist (McNally and Anderson, 2002). Im Falle der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* scheint das $\beta 1$ -Homolog Myospheroid (β_{PS} -Integrin) nicht an der Fusion der Myoblasten, sondern nur an der dem Attachment der Muskeln an die Epidermis beteiligt zu sein. Funktionsanalog sind hier Duf/Kirre und Sns, deren Ausfall ähnlich wie der von $\beta 1$ -Integrin bei Vertebraten zu Ausbleiben der Myoblastenfusion führt.

Eine weitere podosomale Komponente für die ein Nachweis an der Beteiligung von Zellfusionsvorgängen gezeigt werden konnte ist die kleine GTPase Cdc42. Geliefert wird dieser durch den Phänotyp von Mutanten des Cdc42p GEFs Cdc24p. Der Funktionsverlust von Cdc24p verhindert die Zellfusion bei der Bildung der Zygote von Hefezellen, da kein Abbau der Zellwand stattfindet und fusionsrelevante Proteine (möglicherweise auch Cdc42p) nicht korrekt lokalisiert werden (Barale et al., 2004). Ein solcher Phänotyp mit der Fehllokalisation fusionsrelevanter Proteine erinnert an den bei *schizo/loner* Mutanten beobachteten Phänotyp der mit einer Fehllokalisation von DRac einhergeht (Chen et al., 2003). Bei der Myogenese von *D. melanogaster* scheint Cdc42 keine Funktion zu haben, allerdings führt hier der Ausfall der kleinen GTPasen DRac1 und DRac2 zu einem schweren Defekt der Myoblastenfusion (Hakeda-Suzuki et al., 2002).

Zu den weiteren mit Podosomen assoziierten Proteinen gehören Metalloproteasen (MMP, Abb. 5.4.1) wie z.B. ADAM8 (Johanson, 2004) und ADAM12 (Abram et al., 2003). ADAM8 ist an der Zellfusion bei der Bildung von Osteoklasten beteiligt (Choi et al., 2001), das ADAMs-Protein ADAM12 (alpha-Meltrin) wird bei der Myoblastenfusion in Vertebraten benötigt (Yagami-Hiromasa et al., 1995). ADAM12 interagiert mit $\alpha 9/\beta 1$ -Integrin und vermittelt die Assoziation von Myoblasten an sich entwickelnden Myotuben (Lafuste et al., 2005). Eine weitere wichtige Funktion von ADAMs-Proteinen, die auch essentiell für Fusionsprozesse sein könnte, ist die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zellmembranen; Podosomen, die ADAM8 enthalten, degradieren z.B. eine aus VCAM bestehende Matrix (Johanson et al., 2004) und auch die podosomale Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten durch Endothel- und Vascular Smooth Muscle Cells wird durch Metalloproteasen vermittelt (Burgstaller and Gimona, 2005; Osiak et al., 2005). Das der Prozess der Myoblastenfusion mit der Degradation von Komponenten der ECM einhergeht, konnte anhand des Abbaus von Fibronectin durch m-Calpain im Vertebraten-System nachgewiesen werden. Bei Fibronectin handelt es sich um einen Integrinliganden, möglicherweise führt die Degradation von Fibronectin zu einer über Integrin laufende Signalkaskade innerhalb der Myoblasten (Dourdin et al., 1997). Prinzipiell scheint die Entfernung von ECM-Komponenten und störenden Zellmembranbestandteile für den Fusionsprozess essentiell zu sein. Bereits 1979 wurde von Kalderon und Gilula beobachtet, dass bei der Fusion von Hühnermyoblasten partikelfreie Membranabschnitte nachgewiesen werden können.

Da auch bei Myoblastenfusion von *D. melanogaster* ein direkter Membrankontakt hergestellt werden muss, sind ähnliche Prozesse zu fordern, obwohl ein direkter Nachweis noch aussteht. Eine mögliche Funktion einer podosomenähnlichen Struktur wie des PILMACs wäre somit die Verknüpfung des Adhäsions-Prozesses mit einem lokal begrenzten Abbau von für die Fusion nicht benötigten und eventuell beim Membrankontakt störenden Proteinen. Die Beobachtung, dass sowohl bei Vertebraten als auch bei *D. melanogaster* elektronendichte Plaques an der Membran und im extrazellulären Raum im Zuge der Membranfusion auftreten, lässt vermuten, dass es zu einem Ersatz von nicht an der Fusion beteiligten Membran- und ECM-Proteinen durch die fusioneinleitenden Proteinen kommt, die möglicherweise ähnlich wie SNAREs durch eine Konformationsänderung den benötigten Membrankontakt erreichen und Mischung der Bilayer gewährleisten.

Die Beteiligung von ADAMS-Proteinen an der Myogenese von *D. melanogaster* konnte bisher noch nicht direkt gezeigt werden, allerdings führt die Überexpression des in der extrazellulären Matrix lokalisierten ADAMS-Inhibitor Papilin zu einer deutlichen Störung der Myoblastenfusion bei *D. melanogaster* (Kramerova et al., 2000; Fessler et al., 2003) was auf eine Funktion von ADAMS-Proteinen in diesen Prozess hindeutet.

Der Fusionsphänotyp einer WASP-Mutante spricht dafür, dass auch dieser podosomale Regulator (Abb. 5.6.1) in die *Drosophila*-Myogenese involviert ist (Schäfer et al., in Vorbereitung). Bei WASP handelt es sich um das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein. Das Wiskott-Aldrich Syndrom geht mit einer Störung im Aufbau von Podosomen (Linder et al., 1999) und der immunologischen Synapse einher. Die Funktion von WASP ist z.B. essentiell für die Aktivierung des Arp2/3-Komplex, der die F-Aktin-Bildung initiiert. Das Fehlen des F-Aktin Kerns führt zu einer Destabilisierung des Podosoms (Destaing et al., 2003, Linder et al., 2000, Urano et al., 2003). WASP wird außerdem zum Aufbau der immunologischen Synapse benötigt und ist hier an der lateralen Bewegung der Lipid rafts beteiligt. Die Lipid rafts sind für den Aufbau der immunologischen Synapse essentiell, da sie die Transportplattform für die T-Zellrezeptoren und Signalkomplexe bilden und durch die Aggregation dieser Komponenten der cSMAC gebildet wird (Dupre et al., 2002).

Auch für die podosomalen Bestandteile Vinculin und α -actinin (Abb. 5.6.1) gibt es aufgrund Injektionsexperimenten der Proteine in epitheliale Rindernierenzellen (MDBK-Zellen) Hinweise darauf dass diese Proteine in der Lage sind, die Bildung von

multinukleären Zellen zu steuern (Palovuori, 2003). Alpha-Actinin interagiert außerdem mit dem myogeneserelevanten Faktor ADAM12.

Aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten von Podosomen, immunologischer Synapse und PILMAC wäre ein Ziel weiterer Untersuchungen zum Aufbau und Funktion des PILMACs, ob eine solche Struktur auch in die Myoblastenfusion bei Vertebraten involviert ist oder ob die Funktion des PILMACs eventuell von den bereits beschriebenen Podosomen übernommen wird.

5.6.2 Der Aufbau des podosomal adhäsiven Komplex erfolgt unabhängig von den meisten bekannten Komponenten der Fusionsmaschinerie aber ist vermutlich abhängig vom Zellkontakt

Um eine Fusion der beiden Zelltypen FCMs und Founder/Precursorzellen zu erreichen, muss als Grundvoraussetzung eine Adhäsion der Zellen erfolgen und zahlreiche Komponenten der Fusionsmaschinerie müssen an der Membran lokalisiert werden. Dazu gehören z.B. die Bestandteile des Präfusionskomplexes. Bis heute ist wenig darüber bekannt aus welchen Komponenten der Präfusionskomplex und die aus der Auflösung des Komplexes resultierenden Plaques gebildet werden und welche Funktion diese Struktur für den Fusionsprozess hat. Auch ist bisher unklar, ob zunächst eine Zell-Zell-Erkennung und ein Zell-Kontakt erfolgen muss, der im Anschluss den adhäsiven Komplex und die weitere Fusionsmaschinerie an die Kontaktstelle rekrutiert oder ob zunächst die adhäsiven Proteine (und möglicherweise weitere Teile der Fusionsmaschinerie) zu bestimmten Membranarealen transportiert werden und in diesen Bereichen ein Zellkontakt und die anschließende Fusion stattfinden kann. Bekannt ist, dass auf Seiten der Founderzelle die Lokalisation zahlreicher an der Membran benötigter Komponenten von Duf/Kirre und Roughest/Irre-C abhängig ist, da in Doppelmutanten für die entsprechenden Gene weder Rols7 noch Schizo an der Membran lokalisiert sind. Da Schizo vermutlich für die Membranlokalisation von Rac benötigt wird und Rols für die Lokalisation von Titin, ist davon auszugehen, dass Rac und Titin in den Doppelmutanten ebenfalls fehllokalisiert ist (Menon und Chia, 2005, Chen und Olson 2001; Chen et al., 2003). Untersuchungen über die Lokalisation von weiteren fusionsrelevanten Proteinen in *duf/kirre roughest/irre-C* Doppelmutanten liegen bisher nicht vor. Allerdings steht außer Frage, dass es sich bei Duf/Kirre und

Roughest/Irre-C um Proteine handelt, die eine zentrale Rolle bei Organisation und der Lokalisation der Fusionskomponenten an der Membran der Founder/Precursorzelle haben. Eine ähnliche Funktion für Sns auf Seiten der FCMs scheint wahrscheinlich, da bisher jedoch noch keine FCM spezifische Membrankomponente beschrieben ist, konnte dies noch nicht überprüft werden.

Wie Lokalisation von Duf/Kirre und Sns an die Membran gesteuert wird, ist bis heute ungeklärt. Schneider-Zell-Assays und eine Analyse der Verteilung von Sns in Doppelmutanten für *duf/kirre* und *roughest/irre-C* deuten darauf hin, dass der Zellkontakt für die Lokalisation von Duf/Kirre und Sns an der Membran nicht benötigt wird aber die Voraussetzung für die Akkumulation der Proteine im Bereich der Kontaktstellen der Membran ist. Dies würde dafür sprechen, dass der initiale Zellkontakt zu einem Assembly der Fusionsmaschinerie an der Membran führt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse der Verteilung von Rols7, Duf/Kirre und Sns in Wildtypembryonen und in Embryonen verschiedener Fusionsmutanten deutet ebenfalls daraufhin, dass die Lokalisation des Adhäsionskomplexes an die Membran unabhängig von einem Kontakt der FCMs und Founderzellen ist, aber der Aufbau des PILMACs nur bei direktem Zellkontakt erfolgt. So kann in allen analysierten Fusionsmutanten die Lokalisation der Proteine Rols7, Duf/Kirre und Sns an der Membran nachgewiesen werden. Betrachtet man die Verteilung des Duf/Kirre-Protein in *sns20²-Mutanten* bei denen aufgrund des fehlenden Sns-Proteins keine Zellerkennung- und Anheftung mehr stattfindet, ist zu beobachten, dass auch hier das Duf-Protein in Founderzellen zwar mit der Membran assoziiert ist, aber keine PILMACs identifiziert werden können (Abb. 4.7.3b A). In späten Stadien scheint ein Teil des in großen Mengen vorhandenen Duf- Proteins an den Kontaktflächen von Founderzellen zu akkumulieren (Abb. 4.7.3b B). Dies zeigt, dass das Assembly des adhesiven Komplexes und somit vermutlich auch der Rest der Fusionsmaschinerie in den Founder/Precursorzellen abhängig vom initialen Zellkontakt erfolgt. Die Aggregation des Proteins an den Kontaktstellen von Founderzellen (das auch durch Menon und Chia 2005 beschrieben wurde) könnte durch die Fähigkeit von Duf/Kirre homophile Interaktionen einzugehen erklärbar sein (Chen et al., 2003; Galleta et al., 2004). Da die Kontaktflächen zwischen Founder/Precursorzellen untereinander größer sind als die zwischen Founder/Precursorzellen und FCMs erfolgt hier eine relativ großflächige Verteilung des Duf- Proteins. Der Aufbau eines PILMACs ist hier nicht zu beobachten was, den Schluss zulässt, dass der Aufbau dieser Struktur von

dem Kontakt der Founderzelle mit der einer FCM als Partnerzelle abhängig ist. Ein dauerhafter Zellkontakt ist für die Aufrechterhaltung der einmal etablierten Struktur allerdings nicht nötig, was durch die Beobachtung belegt wird, dass bei einigen Fusionsmutanten (z.B. *blow*, Abb 4.7.3 F) in späten Stadien PILMACs beobachtet werden, die nicht mit einer FCM in Kontakt stehen. Es ist davon auszugehen, dass z.B. bei diesen Mutanten initial der Zellkontakt stattgefunden hat, die entsprechende FCM aber später phagocytiiert wurde.

Neben der Tatsache, dass der Zellkontakt eine Voraussetzung für den Aufbau des PILMAC ist, zeigt die Analyse der von Fusionsmutanten der Gene *mbc*, *kette*, *blow* und *schizo*, dass diese Proteine weder in den Aufbau der adhäsiven Struktur noch in die Aufrechterhaltung der podosomalen Morphologie des PILMAC involviert sind, da bei allen Mutanten die Adhäsion von Founder/Precursorzelle mit den FCMs erfolgt und in allen Mutanten sowohl mit Rols7, Duf/Kirre und Sns der ringförmige podosomale Komplex dedektiert werden kann (Abb 4.7.3a A-N). Dies korreliert mit dem in Schröter et al. 2004 entwickelten Modell, bei welchem die Lokalisation und Interaktion von Duf/Kirre und Sns der Funktion von Blow, Kette und Mbc vorausgeht. Auch bei Schizo handelt es sich eindeutig um ein Molekül, das in der Fusionskaskade Duf/Kirre nachgeschaltet ist (Chen et al., 2003). Weniger eindeutig lässt sich in diesem Zusammenhang die Position von Rols7 einordnen. Laut Menon et al., 2005 wird Rols7 zunächst über Duf mit der Membran assoziiert, um dann in den nachfolgenden Fusionsstadien selbst für den Transport und die Integration von Duf in die Membran mit Hilfe von Vesikeln verantwortlich zu sein. Für diese Modell spricht die Beobachtung, dass in *rols*- Mutanten kein vesikulärer Präfusionskomplex mehr beobachtet werden kann und deutlich weniger Duf/Kirre-Protein als in anderen Mutanten dedektiert wird. Dagegen spricht die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass auch in *rols*-Mutanten trotz geringer Proteinmengen bis in Stadium 16 hinein das Duf-Protein an der Precursormembran mutanter Embryonen dedektiert wird (Abb. 4.7.3a J). Geringe Duf-Proteinmengen könnten eine Erklärung dafür sein warum in *rols*-mutanten Embryonen zunächst eine Erkennung und Anlagerung der FCMs und Precursorzellen erfolgt, der adhäsive Kontakt jedoch nur selten aufrecht erhalten wird (Rau et al., 2001). In den anderen Mutanten kommt es dagegen zu einer Akkumulation anormal großer Mengen der Proteine Duf/Kirre und Rols7 in den Founder/Precursorzellen, die bis in späten Stadien nachweisbar sind. Da diese Akkumulation bei allen Fusionsmutanten außer *rols* beobachtet werden

kann, scheint die Akkumulation von fusionsrelevanten Proteinen in den Zellen eine prinzipielle Folge der ausbleibenden Fusion zu sein. Dies spricht dafür, dass die entsprechenden Proteine im Wildtyp einem relativ hohen Turnover unterliegen, d.h. dass die Proteine im Rahmen der Fusion abgebaut bzw. „verbraucht“ werden und gleichzeitig zur Aufrechterhaltung der Fusionsaktivität neu gebildet werden. Findet keine Fusion statt, werden die Proteine nicht abgebaut und aufgrund der ständigen Neubildung von Protein kommt es zur Anhäufung von Duf/Kirre und Rols7 in den Zellen. Würde die Neuproduktion von Proteinen durch einen über Rols7 laufenden Rückkopplungsmechanismus erfolgen, können die relativ geringen Mengen des Duf-Proteins in *rols*-Mutanten durch die fehlende Neu-Synthese von Protein erklärt werden. Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass *rols*-Mutanten neben geringen Duf-Mengen auch relativ geringe Mengen lacZ-Protein produzieren, wenn sie mit der Duf-Enhancer-Trap-Linie rP298 gekreuzt werden (A. Holz, persönliche Mitteilung).

5.6.3 Die Entwicklung eines Modells zum Ablauf der Myoblastenfusion im zweiten Fusionsschritt der Myogenese von *D. melanogaster*

Wie bereits unter Punkt 5.6.1 dargelegt wurden, bisher zwar eine Reihe von Proteinen beschrieben, die in die Myoblastenfusion involviert sind, dennoch existiert bisher kein Modell, welches den Ablauf der Fusion darstellt und Vorgänge wie die Zelladhäsion mit dem Aufbau des Präfusionskomplex, den elektronendichten Plaques und dem Membranabbau verbindet. Die Entdeckung des während der Myogenese gebildeten adhäsiven Komplex mit seinen Ähnlichkeiten zu der immunologischen Synapse und dem Podosom, liefern eine Basis zur Entwicklung eines Modells der Zellfusion bei der Myogenese von *D. melanogaster*. Hinzugezogen werden hierbei auch neue Erkenntnisse über die Funktion verschiedener, in die Fusion involvierter Proteine in anderen Modellsystemen.

Zur Erstellung eines solchen Modells ist ein erster Schritt die Festlegung der Abfolge der Ereignisse und die Einordnung der Funktion bisher bekannter myogenese-relevanter Proteine in diesen Prozess.

Nach der erfolgten Zellerkennung scheint der nächste Schritt die Etablierung des PILMAC im Bereich der Zellkontaktzone zu sein. Ein übereinstimmender Prozess bei dem der Zellkontakt zum Aufbau eines adhäsiven Komplex in der Kontaktzone führt

ist für die immunologische Synapse beschrieben worden. Hierbei ist die Aggregation der Synapse von Lipid Rafts abhängig. Bei Lipid rafts handelt es sich um spezialisierte Membrandomänen, die in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung von anderen Membranbereichen abweichen. Lipid rafts sind dynamisch und können sich innerhalb der Membran lateral bewegen. So erfolgt das Clustering von T-Zell-Rezeptoren und assoziierten Kinasen zur Bildung der immunologischen Synapse nach der Zellerkennung im Rahmen der Immunantwort durch die laterale Bewegung von Lipid Rafts in der Membran. Für die Beweglichkeit der Lipid Rafts wird WASP benötigt (Dupre et al., 2002, Horejsi, 2005) (s. Punkt 5.6.1)

Dafür dass die PILMAC-Komponenten ebenfalls in Lipid rafts organisiert sein könnten spricht der Nachweis der homologen Proteine von Rols (TANC); Sns (Nephrin) und Duf (NEPH1) bei Vertebraten in Lipid rafts (Gerke et al., 2003; Suzuki et al., 2005). Die Beobachtung, dass Mutationen des Lipid raft assoziierten Proteins Caveolin-3 zu Änderungen in der Lipid Raft-Zusammensetzung und zu Hyperfusionen in Zellkulturen aus transgenen Mäusen gewonnener Skelettmuskelzellen führt (Galbiati et al., 2000, Volonte et al., 2003) zeigt, dass Lipid Rafts bzw. Caveolae an dem Prozess der Myoblastenfusion beteiligt sind. Bei den tetraspaninhaltigen Mikrodomänen handelt es sich um eine weitere- von den Lipid Rafts zu unterscheidende- Form von Mikrodomänen. Da Tetraspanine auch in Zellfusionvorgänge involviert sind und Rols7 z.B. laut FlyGrid (Giot et al., 2003) mit einem Tetraspanin interagiert ist die Involvierung von tetraspaninhaltigen Mikrodomänen am Fusionsprozess nicht auszuschließen. Auch bei dem Aufbau der immunologischen Synapsen scheinen neben Lipid rafts tetraspaninhaltige Mikrodomänen beteiligt zu sein (Vogt et al., 2002).

Dem Aufbau des PILMACs folgt die Bildung des Präfusionskomplexes mit der Positionierung der elektronendichten Vesikeln an beiden Seiten der Membran und elektronendichten Material im extrazellulären Raum zwischen den paarigen Vesikeln. Aufgrund der bisher bekannten Datenlage ist die Ausbildung des Präfusionskomplexes abhängig von Rols7, da in *rols*- Mutanten kein Präfusionskomplex mehr nachgewiesen werden kann. Es ist jedoch unklar, ob die elektronendichten Vesikel nicht mehr gebildet werden oder ob sie nicht mehr an der Membran lokalisiert sind. Bisher ist auch noch nicht geklärt warum die FCM-Zellen in *rols*-Mutanten nicht in der Lage sind den Präfusionskomplex halbseitig aufzubauen. Das Fehlen der elektronendichten Vesikeln auf Seiten der FCMs deutet darauf hin,

dass zur symmetrischen Ausbildung dieser Struktur eine Zell-Zell-Kommunikation stattfindet, die über den bloßen Zell-Kontakt hinausgeht, da der Zellkontakt initial bei *rols*-Mutanten hergestellt wird. Dafür spricht auch die Analyse des *blow*-Phänotyps, da Blow nur in den FCMs exprimiert wird (Schröter et al., submitted), der Ausfall der Genfunktion jedoch die Ausbildung der elektronendichten Plaques in beiden Zellpopulation beeinträchtigt. Duf und Sns könnten bei der Lokalisation der Vesikel auch eine Funktion haben, da z.B. im Falle der *C.elegans* Homologen SYG-1 und SYG-2 Mutationen zu einer Misslokalisierung bestimmter Synapsen führt und die Anzahl der exocytotischen Vesikel innerhalb dieser Synapsen reduziert ist (Shen et al., 2004). Dieser Vorgang kann mit dem bei der zytotoxischen immunologischen Synapse erfolgendem Vorgang verglichen werden, bei dem nach dem Kontakt einer CTL mit einer Zielzelle zunächst der adhäsive Ring gebildet wird und anschließend sekretorische Lysosomen zum cSMAC transportiert werden (Stinchcombe et al., 2001b). Ein anderes Modell, bei dem die adhäsiven Komponenten über den Präfusionskomplex an die Membran gebracht werden (Menon et al., 2005) erscheint eher unwahrscheinlich, da die Adhäsion auch im ersten Schritt der Fusion essentiell ist bei dem bisher kein Präfusionskomplex nachgewiesen wurde. Außerdem läuft auch bei Mutanten mit fehlenden Präfusionskomplex (wie z.B. *rols*) die Zellerkennung und die Zelladhäsion (zumindest initial) korrekt ab.

Da aus den elektronendichten Vesikeln des Präfusionskomplexes die elektronendichten Plaques mit relativ großen Mengen elektronendichtem Material im extrazellulären Raum hervorgehen (im Vergleich zu dem elektronendichten Material zwischen Vesikeln) muss es sich bei dem Schritt, der zur Auflösung des Präfusionskomplex führt, um einen exocytotischen Vorgang handeln. Dieser lokalisiert das elektronendichte Material der Vesikel in die Membran und den extrazellulären Raum. Bei einer der sekretierten Komponenten könnte es sich um eine Metalloprotease handeln. Aufgrund der Beobachtung, dass eine Überexpression des ECM-Proteins und Metalloproteaseinhibitor Papilin (Kramarova et al., 2000) zu einem Fusionsphänotyp bei *D. melanogaster* führt, erscheint die Involvierung von Metalloproteasen in die Myoblastenfusion wahrscheinlich. Für diese Hypothese sprechen auch die Ähnlichkeit des PILMACs mit einem Podosom und die Beobachtung dass eine Degradierung von ECM-Komponenten eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Myoblastenfusion bei Vertebraten ist, wie es z.B. im Falle der Fibronectindegradation durch Calpain gezeigt wurde.

Da prinzipiell zur Fusion von Membranen ein direkter Membrankontakt hergestellt werden muss, ist die Beteiligung von Proteinen wahrscheinlich, die aufgrund einer raschen Konformationsänderung wie bei den SNARE-Proteinen oder Hemagglutinin einen Membrankontakt herbeiführen können. Da es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass Duf/Kirre, Roughest/Irre-c oder Sns die Fähigkeit dazu haben (z.B. durch das Vorhandensein einer fusionspeptidähnlichen Sequenz) ist anzunehmen, dass ein bisher nicht identifiziertes Protein eine solche Funktion übernimmt. Somit würde die Erkennung der Ziellmembranen und die Einleitung der Membranmischung bei extrazellulären Fusionen nicht wie bei intrazellulären Fusionen über die gleichen Moleküle laufen, sondern über getrennte Proteine. Bei einer Lokalisation dieser Proteine in der Membran der elektronendichten Vesikeln könnten diese nach der Exocytose der Vesikel und der Entstehung der elektronendichten Plaques aufgrund der bereits paarig angeordneten Vesikeln sofort in Kontakt treten und die Membranfusion einleiten.

Auch das Podosom und die zytotoxische immunologische Synapse sekretieren Proteasen bzw. lytische Enzyme, wobei z.B. die Aktivität der lytischen Enzyme der zytotoxischen Synapse wahrscheinlich durch den adhäsiven Ring eingegrenzt wird (Stinchcombe et al., 2001b, Friedl and Storch, 2004). Ausgehend von einer podosomenartigen Struktur bzw. einer Struktur ähnlich wie einer zytotoxischen immunologischen Synapse würde sich die Aktivität der Proteasen auf den Kern der PILMAC beschränken und der Ring die Aktivität begrenzen. Dies würde den Fusionsprozess selbst auf den Kern des PILMACs eingrenzen (Membranfusionen innerhalb des Komplexes wurden auch bei der zytotoxischen immunologischen Synapse beschrieben, allerdings scheint die Fusion unabhängig von der gleichzeitig erfolgenden Exocytose sekretorischer Lysosomen zu sein, Stinchcombe et al., 2001b) und dem Ring würden Funktionen ähnlich wie einer Adherens junction und Tight junction bzw. Septate junction bei Invertebraten zukommen (Adhäsion und Abgrenzung von extrazellulären Kompartimenten). Dies scheint aufgrund der Eigenschaften der Ring-Komponenten nicht unwahrscheinlich. So wird Duf bei der ektopischen Expression in Speicheldrüsen automatisch in die Adherens junction rekrutiert und in Folge auch ektopisch exprimiertes Rols7 (Menon und Chia, 2005). Laut FlyGrid interagiert Rols7 mit der echinoid dem *D. melanogaster* Homolog der Tight junction Komponente ZO-1 (Giot et al., 2003). ZO-1 liegt in der Podocytenmembran der Säugerniere wiederum mit dem Sns-homolog Nephrin in

einem Multiproteinkomplex vor (Review Huber und Benzig, 2005). Bei einer Eingrenzung der fusionierenden Membran auf den Kern des PILMACs ist eine Ausweitung der Struktur im Verlauf der Fusion erforderlich. Der Nachweis von vergrößerten Ringen mit näher aneinander liegenden Zellen bei Wildtypembryonen belegt, dass mit der Fusion tatsächlich eine Zunahme des Ringdurchmessers einhergeht. Ist die Positionierung der Vesikel tatsächlich abhängig von Duf/Kirre und Rols7 auf Seiten der Founderzelle und SNS auf Seiten der FCMs würde eine Vergrößerung der Ringstruktur die Fusionsmaschinerie immer weiter lateral über die Zelloberfläche ziehen. Dabei würde sich im Kern des PILMACs die vesikulierende Membran befinden und weiter nach außen elektronendichte Plaques und elektronendichte Vesikel. Dies würde die Beobachtung erklären das die elektronendichten Plaques immer in der Nachbarschaft von vesikulierenden Membranen zu finden sind (Doberstein et al., 1997).

Eine solche Beschreibung des Fusionsprozesse korreliert mit den Beobachtungen die bei der Fusion epithelialer Zellen von *C. elegans* gemacht wurden. Hier konnte durch Markierung der Adherens junction gezeigt werden, das sich bei der Fusion hypodermaler Zellen die Fusion der sich in basale Richtung bewegendes apikalen Adherens junction folgt und sich die Fusionspore radial immer weiter öffnet (s. Abb. 5.6.3a). An der Grenze der Adherens junction zur Fusionspore kann dabei ähnlich wie bei der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* vesikulierendes Membranmaterial nachgewiesen werden (Mohler et al., 1998).

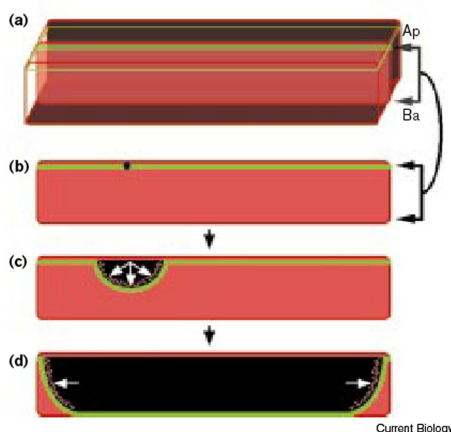


Abb. 5.4.3a: schematische Darstellung der Zellfusion in der Hypodermis von *C. elegans*. Oberhalb oder innerhalb der Adherens junction (grün) öffnet sich die Fusionspore die sich radial erweitert. Dabei wandert die Adherens junction in basaler Richtung. Die Plasmamembran (rosa) vesikuliert ins Innere der Fusionspore. (aus Mohler et al., 1998)

Ein solches Modell würde erfordern, dass bei im Zuge der radialen Ausdehnung der fusionierenden Membranbereiche beständig neues Material der Fusionsmaschinerie an den Rand der Struktur transportiert würde, während es im Kernbereich abgebaut wird. Ausgehend von der Annahme das für die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese der Zellkontakt ausreichend ist, könnte dies die Beobachtung

erklärten, dass es in den bei den meisten der Fusionsmutanten zu einer Akkumulation von fusionsrelevanten Proteinen kommt. Außerdem könnte das Zustandekommen der vergrößerten elektronendichten Plaques z.B. bei *kette*-Mutanten durch eine Ausdehnung der Komplexes bei ausbleibender zentraler Membranvesikulation erklärt werden.

Auch die Funktion der bisher bekannten fusionsrelevanten Proteine mit ihrem jeweiligen Phänotyp kann in dieses Modell eingeordnet werden. Die Rolle von Duf/Kirre und Sns als zentrale Moleküle bei der Zellerkennung und der Organisation der Fusionsmaschinerie steht dabei außer Frage (Abb.5.6.3b 1a + b). Eine der Funktionen des Rols7-Proteins wäre die Verknüpfung des Präfusionskomplexes mit den Ringkomponenten des PILMACs, um die Fusion im Kontaktareal einzuleiten, sowie bei der Signaltransduktion zur weiteren Synthese von fusionsrelevanten Proteinen (Abb. 5.6.3b 2a + b). Das Blow-Protein wird bei diesem Prozess benötigt, um die Exocytose der elektronendichten Vesikel in den FCMs einzuleiten (Abb. 5.6.3b 3a + b). Das entsprechende Protein in den Founder/Precursorzellen wurde bisher nicht identifiziert. Das Ausbleiben der Exocytose bei *blow*- Mutanten führt dazu, dass kein echter Membrankontakt hergestellt werden kann und somit keine Mischung der Bilayer erfolgt. Außerdem kommt es zu keiner Ausweitung der Ringstruktur und keiner weiteren Anhäufung von Komponenten des Präfusionskomplexes. An einem ähnlichen Punkt wie das Blow-Protein muss die Funktion von Kette angesetzt werden (Abb 5.6.3b 4a + b). *Kette*-Mutanten stoppen zwar in einem späteren Schritt der Fusion und bilden die elektronendichten Plaques, dennoch ist aus bisher noch ungeklärten Gründen Kette in der Lage den Blow Phänotyp zumindest teilweise zu retten. Eine Verknüpfung der Blow- Funktion mit exocytotischen Vorgängen lässt sich über die Interaktion von Blow mit Crk herstellen. Crk ist ein Interaktionspartner der DOCK-180 Superfamilie von GEFs (Abb. 5.6.3b 3a + b). Bei dieser Familie handelt es sich um GEFs für die kleine GTPase Rac, sowohl Rac als auch das DOCK-180 homolog Mbc sind essentiell für die Fusion bei *D. melanogaster* (Hakeda-Suzuki et al., 2002 und Rushton et al., 1995). Die GTP- Form der kleinen GTPase Rac ist in der Lage die Exocytose von synaptischen Vesikeln zu steuern (Humeau et al., 2002). In der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* könnte Rac1 und Rac2 eine analoge Funktion haben (Abb. 5.6.3b 3a + b). Die Expression der konstitutiv- aktiven Rac-Form Drac1^{G12V} führt zu einer Fusionsstörungen aufgrund der unzureichenden Vesikulierung der Membran was bedeutet, dass nach

erfolgter Exocytose für eine erfolgreiche Vesikulation eine Inaktivierung von Rac stattfinden muss (Doberstein et al., 1997). Ob Rac noch in weitere fusionsrelevante Schritte involviert ist, ist bisher unklar, dafür sprechen könnte der Phänotyp von Mbc und der Rac1 und Rac2- Doppelmutante (Abb.4.7.3b). Rac1 und Rac2 Doppelmutanten stoppen ebenso wie MBC bereits im ersten Fusionsschritt (persönliche Mitteilung Önel). In diesem Schritt konnte bisher kein Präfusionskomplex nachgewiesen werden. Allerdings muss dies nicht bedeuten, dass an diesem Schritt prinzipiell keine elektronendichten Vesikel beteiligt sind. So besteht z.B. die Möglichkeit, dass es zwar zu einer Exocytose von Vesikeln kommt, aber kein symmetrischer Präfusionskomplex aufgebaut wird, was die Dedektion der Vesikel deutlich erschweren würde. Initiale Prozesse, wie die Zellerkennung, die Bildung der Filopodien und Zelladhäsion sind aber auf jeden Fall unabhängig von Rac, da diese sowohl in *rac1rac2*-Doppelmutanten als auch in *mbc*-Mutanten erfolgen. Die Beobachtung von Doberstein et al., 1997, dass die Myoblasten in Mbc-Mutanten relativ leicht entfernt werden können ist somit nicht auf eine mangelnde Zellerkennung und Adhäsion zurückzuführen. Möglicherweise ist der Komplex jedoch nicht so stabil wie in anderen Mutanten oder im Wildtyp. Generell weisen die *rac1rac2*- und die *mbc*-Mutanten einen sehr ähnlichen Phänotyp auf was für die Hypothese spricht, dass es sich bei Mbc um ein GEF für die GTPase Rac handelt und somit z.B. für den Transport von Rac1 und Rac2 an die Membran benötigt wird. Auf ähnlicher Stufe könnte die Funktion von Schizo und ARF6 liegen (Abb. 5.6.3b 3a + b). Bei Schizo handelt es sich um den GEF für die GTPase ARF6. ARF6 und Schizo werden vermutlich benötigt um Rac an die Membran zu transportieren und könnten somit ähnliche Prozesse steuern wie Mbc. Anhand von *schizo*-Mutanten konnte gezeigt werden dass dieses Protein wie Mbc schon im ersten Fusionsschritt benötigt wird (Chen et al., 2003). Ob es sich bei Schizo und ARF6 um parallel zu MBC arbeitenden Rac interagierenden Proteinen handelt oder ob diese in unterschiedlichen Zelltypen gleiche Funktionen erfüllen ist unklar. Es ist zwar bekannt, dass Schizo nur in den Founder- und Precursorzellen vorkommt (Chen et al., 2003) aber zur zellulären Lokalisation von MBC liegen nur Untersuchungen ohne Berücksichtigung der Unterschiede von Founder- und fusionskompetenter Zelle vor. Wenige Daten gibt es bisher zu der Funktion von WASP. Mutationen im *wasp*-Gen scheinen auch zu Störungen in der Myoblastenfusion zu führen (Schäfer 2004, Diplomarbeit; Schäfer et al., in Vorbereitung). Zu einer möglichen Funktion von in der

Myogenese von *D. melanogaster* WASP gibt es zahlreiche Ansatzpunkte (Abb 5.6.3). Bei WASP handelt es sich prinzipiell um einen Regulator des F- Actin-Cytoskelett der sowohl in die Podosomenformation, als auch in die laterale Bewegung von Lipid Rafts bei der immunologischen Synapse involviert ist (Dupre et al., 2002). Außerdem ist WASP vermutlich an exocytotischen Vorgängen beteiligt (Gasman et al., 2004), interagiert mit Crk (Giot et al., 2003) und hat die Funktion eines Effektors von Kette im ZNS (Bogdan und Klämbt, 2003).

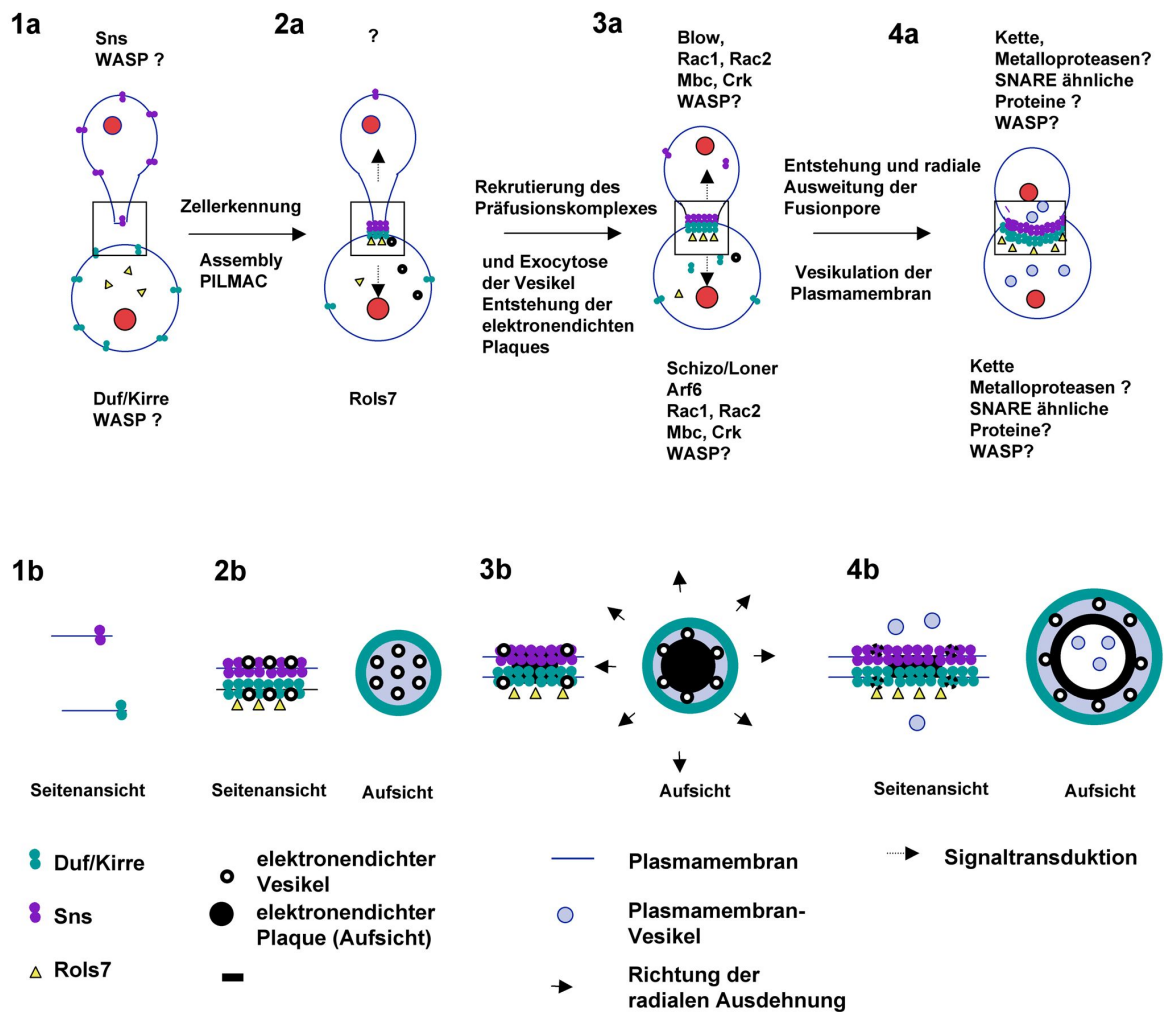


Abb. 5.6.3b: schematische Darstellung des Aufbaus der Fusionsmaschinerie und des Ablaufs der Fusion bei der Myogenese von *D. melanogaster*. Die Skizzen in der oberen Reihe 1a-4a zeigen jeweils eine zelluläre Übersicht, während in der unteren Reihe 1b-4b jeweils den Fusionskomplex als Ausschnittsvergrößerung darstellt. 1a und b zeigen die erste Phase der Fusion: die Zellerkennung die von Duf/Kirre und Sns abhängt. Im Zuge des Zellkontakts erfolgt das Assembly der PILMACs (möglicherweise abhängig von der durch WASP gesteuerten Bewegung von Lipid rafts) und anschließend das von Rols7 abhängige Assembly des Präfusionskomplexes (2a und 2b). Eine durch den Zellkontakt und möglicherweise über Rols7 laufende Signaltransduktion zur Aufrechterhaltung der Proteinexpression ist wahrscheinlich. Im nächsten Schritt erfolgt die Exocytose der Vesikel, welche abhängig ist von Rac, Blow und den GEFs Mbc und Schizo/Loner weitere in diesen Prozess involvierte Proteine könnten Crk, Arf6 und WASP sein. Die Exocytose der Vesikel führt zur Ausbildung der elektronendichten Plaques. Die

Zusammensetzung der Plaques ist bisher nicht bekannt. Mögliche Komponenten sind Metalloproteasen und SNARE- ähnliche Proteine (3a und 3b). Durch die Konformationsänderung SNARE ähnliche Proteine kann es zum Membrankontakt und zur Verschmelzung der Bilayer kommen, ein Prozess der bei *kette*- mutanten Embryonen gestört ist. Der Abbau der Membran erfolgt durch die anschließende Vesikulation der Membran für diesen Vorgang ist die Inaktivierung von Rac essentiell, gleichzeitig muss sich der Komplex radial ausdehnen (4a und 4b).

Im Zuge dieses Modells kann der Fusionsprozess bei der zweiten Fusionswelle in 6 wichtige Phasen unterteilt werden, in denen z.T. unterschiedliche myogenese-relevante Proteine benötigt werden

1. Zellerkennung und Zellkontakt: die Zellerkennung erfolgt über Duf/Kirre bzw. Roughest/Irre-C und Sns sowie möglicherweise Hibris (Abb. 5.6.3b 1a + b)
2. Assembly des PILMACs: das Assembly könnte durch Membranmikrodomänen wie Lipid rafts und/oder tetraspaninhaltige Mikrodomänen vermittelt werden hier könnte ein Ansatzpunkt für die Funktion von WASP sein (Abb. 5.6.3b 2a + b)
3. Rekrutierung des Präfusionskomplex: die Ausbildung des Präfusionskomplex ist in den Founderzellen abhängig von Duf/Kirre bzw. Roughest/Irre-C und Rols7. Für die FCMs ist die noch keine Komponente beschrieben die Funktion von Rols7 übernimmt (Abb. 5.6.3b 2a + b, 3a + b)
4. Exocytose der elektronendichten Vesikel: Die Exocytose der elektronendichten Vesikel ist abhängig von Blow (in den FCMs), das hierbei vermutlich über Crk mit Mbc interagiert und so zur Rekrutierung von Rac an die Membran beiträgt. Dieser Prozess wird gleichzeitig auch von Schizo/Loner und Arf6 gesteuert (in den Founderzellen) (Abb. 5.6.3b 3a + b)
5. Herstellung des Membrankontakts und Membranismischung: *Kette*-Mutanten sind trotz erfolgreicher Vesikelexocytose nicht in der Lage die Mischung der Membranen zu initiieren, was dafür spricht, dass an diesem Punkt eine Umlagerung des Cytoskeletts erfolgen muss (die möglicherweise auch von WASP abhängig ist). Außerdem ist hier die Beteiligung von Proteasen und SNARE- ähnlichen Molekülen wahrscheinlich (Abb. 5.6.3b 4a + b)
6. Vesikulation und Recycling der Membran und Erweiterung des Komplexes: Im letzten Schritt müssen die überflüssigen Membrankomponenten über Vesikel abgebaut werden. Das Fortschreiten der Membranfusion erfolgt durch die radiale Erweiterung des PILMACs und somit der gesamten Fusionsmaschinerie, hierbei findet ein Turnover der beteiligten Proteine statt, da die Struktur peripher erweitert werden muss, während zentral die Membran

abgebaut wird. Die Vesikulation und/oder die Erweiterung des Fusionskomplexes erfordern die Inaktivierung von Rac (Abb 5.6.3b 4a + b)

Abmayr S.M., Balagopalan L., Galetta B.J. and Hong S.J. (2005)

Myogenesis and muscle development

Comprehensive Molecular Insect Science **2**, 1-45

Abram C.L., Seals D.F., Pass I., Salinsky D., Maurer L., Roth T.M. and Courtneidge S.A. (2003)

The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Scr-transformed cells

J Biol Chem. **278**, 16844-16851

Apitz H., Strunkelnberg M., De Couet H.G. and Fischbach K.F. (2005)

Single-minded, Dmef2, Pointed, and Su(H) act on identified regulatory sequences of the *roughest* gene in *Drosophila melanogaster*.

Dev Genes Evol. **215**, 1-10

Arnosti D.N., Barolo S., Levine M. and Small S. (1996)

The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy

Development **122**, 205-214

Artero R., Prokop A., Paricio N., Begemann G., Pueyo I., Mlodzik M., Perez-Alonso M. and Baylies M.K. (1998)

The *muscleblind* gene participates in the organization of Z-Bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2

Dev Biol. **195**, 131-143

Artero R., Furlong E.E., Beckett K., Scott M.P. and Baylies M. (2003)

Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis

Development **130**, 6257-6272

Aruga J. (2004)

The role of Zic genes in neural development

Mol Cell Neurosci. **26**, 205-221

Azpiaz N. and Frasch M. (1993)

tinman and *bagpipe*: two hemeo box genes that determine cell fate in the dorsal mesoderm of *Drosophila*

Genes Dev. **7**, 1325-1340

Azpiaz N., Lawrence A.P., Vincent J., Frasch M. (1996)

Segmentation and spezification in the *Drosophila* mesoderm

Genes Dev. **10**, 3183-3194

Balagopalan L., Keller C.A. and Abmayr S.M. (2001)

Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila nautilus* gene is not essential for embryonic myogenesis or viability

Dev Biol **231**, 374-382

- Barale S., McCusker D. and Arkowitz R.A.** (2004)
The exchange factor Cdc42 is required for cell fusion during yeast mating
Eukaryot Cell **3**, 1049-1061
- Bate M., Rushton E. and Frasch M.** (1993)
A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis
Dev Suppl, 149-161
- Baylies M. K. and Bate M.** (1996)
Twist: a myogenic switch in *Drosophila*
Science **272**, 1481-1484
- Baylies M. K., Bate M. and Ruiz-Gomez M.** (1998)
Myogenesis: a view from *Drosophila*
Cell **93**, 921-927
- Birnboim H.C. and Doly J.** (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucl. Acid Res. **7**, 1513-1523
- Block K.L., Vornlocher H.P. and Hershey J.W.** (1998)
Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3
J Biol Chem **273**, 31901-31908
- Boffelli D., McAuliffe J., Ovcharenko D., Lewis K.D. Ovcharenko I., Pachter L. and Rubin E.M.** (2003)
Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome
Science **299**, 1391-1394
- Bogdan S. and Klämbt C.** (2003)
Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp
Development **130**, 4427-4437
- Bour B.A., O'Brian M.A., Lookwood W.L., Goldstein E.S., Bodmer R., Taghert P.H., Abmayr S.M. and Nguyen H.T.** (1995)
Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis
Genes Dev. **9**, 240-255
- Bour B.A., Chakravarti M., West J.M. and Abmayr S.M.** (2000)
Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion
Genes Dev. **14**, 1498-1511
- Brunner D., Ducker K., Oellers N., Hafen E., Scholz H and Klambt C.** (1994)
The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway
Nature **370**, 330-334

- Buccione R., Orth J.D. and McNiven M.A.** (2004)
Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles
Nat Rev Mol Cell Biol **5**, 647-657
- Bucher P.** (1990)
Weight matrix description of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences
J Mol Biol. **212**, 563-578
- Buff E., Carmena A., Gisselbrecht S., Jimenez F. and Michelson A.M.** (1998)
Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle precursors
Development **125**, 2075-2086
- Buratti E., Tisminetzky S., Zotti M. and Baralle F.E.** (1998)
Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3
Nucleic Acid Res. **26**, 3179-3187
- Burgstaller G. and Gimona M.** (2005)
Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells
Am J Physiol Heart Circ Physiol. **288**, 3001-3005
- Burke T.W. and Kadonaga J.T.** (1997)
The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*
Genes Dev. **11**, 3020-3031
- Carmena A., Gisselbrecht S., Harrison J., Jimenez F. and Michelson A.M.** (1998)
Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm
Genes Dev. **12**, 3910-3922
- Carmena A., Murugasu-Oei B., Menon D., Jimenez F. and Chia W.** (1998)
Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell division during *Drosophila* myogenesis
Genes Dev. **12**, 217-231
- Carmena A., Bate M. and Jimenez F.** (1995)
Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis
Genes Dev. **9**, 2373-2383
- Chalkley G.E. and Verrijzer C.P.** (1999)
DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator
EMBO J. **18**, 4835-4845

Chaudhuri J., Chakrabarti A. and Maitra U. (1997)

Biochemical characterization of the mammalian translation initiation factor 3 (eIF3). Molecular cloning reveals that p110 subunit is the mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* protein Prt1

J Biol Chem. **272**, 30975-30983

Chen E.H. and Olson E.N. (2001)

Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*

Dev Cell **1**, 705-715

Chen E.H., Pryce B.A., Tzeng J.A., Gonzalez G.A. and Olson E.N. (2003)

Control of myoblast fusion by a guanine eychange factor, loner, and ist effector ARF6

Cell **114**, 751-762

Choi S.J., Han J.H. and Roodman G.D. (2001)

ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor

J Bone Miner Res. **16**, 814-822

Chudinova E.M., Ivanov P.A. and Nadezhdina E.S. (2004)

Nuclear localization signals in p170 the large subunit of translation initiation factor 3

Mol Biol **38**, 575-581

Costas J., Casares F. and Vieira H. (2003)

Turnover of binding sites for transcription factors involved in early *Drosophila* development

Gene **310**, 215-220

Cote J.F and Vuori K. (2002)

Identification of an evolutionary conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity

J Cell Sci. **115**, 4901-4913

Damm C., Wolk A., Buttgereit D., Loher K., Wagner E, Lilly B., Olson E.N., Hasenpusch-Theil K. and Renkawitz-Pohl R. (1998)

Independent regulatory elements in the upstream region of the *Drosophila beta 3 tubulin* gene (*betaTub60D*) guide expression in the dorsal vessel and the somatic muscles

Dev Biol. **199**, 138-149

Dantonel J.C., Wurtz J.M., Poch O., Moras D. and Tora L. (1999)

The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa?

Trends Biochem Sci **24**, 335-339

Dantonel J.C., Quintin S., Lakatos L., Labouesse M. and Tora L. (2000)

TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*

Mol Cell **6**, 715-722

David-Pfeuty T. and Singer S. J. (1980)

Altered distribution of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by the Rous sarcoma virus
Proc Natl Acad Sci USA **77**, 6687-6691

Dermitzakis E.T., Bergman C.M. and Clark A.G. (2003)

Tracing the evolutionary history of *Drosophila* regulatory regions with models that identify transcription factor binding sites
Mol Biol Evol **20**, 703-714

DeSimone S.M. and White K. (1993)

The *Drosophila erect wing* gene, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein
Molec. Cell. Biol. **13**, 3641-3649

Destaing O., Saltel F., Geminard J.C. Jurdic P. and Bard F. (2003)

Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein
Mol Biol Cell. **14**, 407-416

Dikstein R., Zhou S. and Tjian R. (1996)

Human TAFII 105 is a cell type-specific TflID subunit related to hTAFII130
Cell **87**, 137-146

Doberstein S.K., Fetter R.D., Metha A.Y. and Goodman C.C. (1997)

Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex
J Cell Biol **136**, 1249-1261

Dong R., Cwynarsky K., Entwistle A., Marelli-Berg F., Dazzi F., Simpson E., Goldman J.M., Melo J.V., Lechler R.I. Bellantuono I., Ridley A. and Lombardi G. (2003)

Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration
Blood **101**, 3560-3567

Dong Z., Liu L.H., Han B., Pincheira R. and Zhang J.T. (2004)

Role of eIF3p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth
Oncogene **23**, 3790-3801

Donnadieu E., Revy P. and Trautmann A. (2001)

Imaging T-cell antigen recognition and comparing immunological and neuronal synapses
Immunology **103**, 417-425

Donoviel D.B., Freed D.D., Vogel H., Potter D.G., Hawkins E., Barrish J.P., Mathur B.N., Turner C.A., Geske R., Montgomery C.A., Starbuck M., Brandt M., Gupta A., Ramirez-Solis R., Zambrowicz B.P. and Powell D.R. (2001)

Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN

Mol Cell Biol. **21**, 4829-36

Dourdin N., Brustis J.J., Balcerzak D., Elamrani N., Poussard S., Cottin P. and Ducastaing A. (1997)

Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain

Duan H., Skeath J.B. and Nguyen H.T. (2001)

Drosophila Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development

Development **128**, 4489-4500

Dupre L., Aiuti A., Trifari S., Martino S., Saracco P., Bordignon C. and Roncarolo M.G. (2002)

Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation

Immunity **17**, 157-166

Dustin M.L. and Cooper J.A. (2000)

The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling

Nat Immunol. **1**, 23-29

Dworak H.A., Charles M.A., Pellerano L.B. and Sink H. (2001)

Characterisation of *Drosophila hibris*, a gene related to human nephrin

Development **128**, 4265-4276

Erickson M.R., Galletta B.J. and Abmayr S.M.

Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organisation

J Cell Biol. **138**, 589-603

Fessler J.H., Kramerova I., Kramerov A., Chen Y. and Fessler L.I. (2004)

Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM development

Int J Biochem Cell Biol. **36**, 1079-1084

Frasch M. (1995)

Induktion of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal *Dpp* in the early *Drosophila* embryo

Nature **374**, 464-467

Freiman R.N., Albright S.R., Zheng S., Sha W.C. Hammer R.E. and Tjian R. (2001)

Requirement of a tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development

Science **293**, 2084-2087

Friedl P. and Storim J. (2004)

Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse

TRENDS in Cell Biol. **14**, 557-567

Galbiati F, Volente D., Brown A.M., Weinstein D.E., Ben-Ze'ev A., Pestell R.G. and Lisanti M.P. (2000)

Caveolin-3 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains

Natl Acad Sci USA **97**, 9689-9694

Galletta B.J., Niu X.P., Erickson M.R. and Abmayr S.M. (1999)

Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC

Gene **228**, 243-252

Galletta B.J., Chakravarti M., Banerjee R. und Abmayr S.M. (2004)

SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts

Mech Dev. **121**, 1455-1468

Gasman S., Chasserot-Golaz S., Malacombe M., Way M. and Bader M.F. (2004)

Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: A role for subplasmalemmal Cdc42/N-Wasp- induced actin filaments

Mol Biol Cell **15**, 520- 531

Gerke P., Huber T.B., Sellin L., Benzing T. and Walz G. (2003)

Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins Nephrin and NEPH1

J Am Soc Nephrol. **14**, 918-926

Giebel B. (1999)

The Notch signaling pathway is required to specify muscle progenitor cells in *Drosophila*

Mech Dev. **86**, 137-145

Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y.L., Ooi C.e., Godwin B., Vitols E., Vijayadamodar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Iome N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carolla S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finkley R.Ljr., White K.P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J. and Rothberg J.M. (2003)

A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*

Science **302**, 1727-1736

Hakeda-Suzuki S., Ng J., Tzu J., Dietzl G., Sun Y., Harms M., Nardine T., Luo L. and Dickson B.J. (2002)

Rac function and regulation during *Drosophila* development

Nature **416**, 438-442

Halfon M.S., Carmena A., Gisselbrecht S., Sackerson C.M., Jimenez F., Baylies M.K. and Michelson A.M. (2000)

Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal- activated and tissue-restricted transcription factors

Cell **103**, 63-74

Hansen S.K., Takada S., Jacobson R.H. Lis J.T. and Tjian R. (1997)

Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF.

Cell **91**, 71-83

Hasegawa H., Kiyokawa E., Tanaka S., Nagashima K., Gotoh N., Shibuya M., Kurata T. and Matsuda M. (1996)

DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane

Mol Cell Biol. **16**, 1770-1776

Hirayama E., Inoue N., Kamata M., Ama M. und Kim J. (2000)

Dynamic distribution of an antigen involved in the differentiation of avian myoblast: II.

Possible association of beta 1 integrin with myofibril organization

Cell Motil Cytoskeleton **45**, 27-41

Hiller M.A., Lin T.Y. Wood C. and Fuller M.T. (2001)

Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog

Genes Dev. **15**, 1021-1030

Hiller M., Chen X., Pringle M.J., Suchorolski M., Sancak Y., Viswanatha S., Bolival B., Lin T.Y., Marino S. and Fuller M.T. (2004)

Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program

Development **131**, 5297-5308

Hochheimer A., Zhou S., Zheng S., Holmes M.C. and Tjian R. (2002)

TRF2 associate with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*

Nature **420**, 439-445

Hochheimer A. and Tjian R. (2003)

Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression

Genes Dev. **17**, 1309-1320

Holmes M.C. and Tjian R. (2000)

Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1

Science **288**, 867-870

Horejsi V. (2005)

Lipid rafts and their roles in T-cell activation

Microbes Infect. **7**, 310-316

Horsley V., Jansen K. M., Mills S.T. and Pavlath G. K. (2003)

IL-4 acts as myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth
Cell **113**, 483-494

Humeau Y., Popoff M.R., Kojima H., Doussau F. and Poulain B. (2002)

Rac GTPase plays an essential role in exocytosis by controlling the fusion competence of the release sites
J Neurosci. **22**, 7968-7981

Ince T.A. and Scotto K.W. (1995)

A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters
J Biol Chem. **270**, 30249-30252

Inoue-Hyodo N. and Kim J. (1996)

Dynamic distribution of an antigen involved in differentiation of quail myoblasts transformed with Rous sarcoma virus: I. Requirement of its quantitative expression on the cell surface for myoblast fusion
Cell Struct Funct. **21**, 515- 524

Jahn R., Lang T. and Sudhof T.C. (2003)

Membrane fusion
Cell **112**, 519-533

Jinks T.M., Calhoun G and Schedl P. (2003)

Functional conservation of the sex-lethal sex determining promoter, Sxl-Pe, in *Drosophila virilis*
Dev Genes Evol. **213**, 155-165

Johansson M.W., Lye M.H. Barthel S.R., Duffy A.K. Annis D.S. and Mosher D.F. (2004)

Eosinophils adhere to vascular cell adhesion molecule-1 via podosomes
Am J Respir Cell Mol Biol **31**, 413-422

Kalderon N. and Gilula N.B. (1979)

Membrane events involved in myoblast fusion
J Cell Biol. **81**, 411-425

Kaushal S., Schneider J.W. Nadal-Ginard B. and Mahdavi V. (1994)

Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD
Science **266**, 1236-1240

Klämbt C. (1993)

The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glia cells
Development **117**, 163-176

Kramerova I.A., Kawaguchi N., Fessler L.I., Nelson R.E., Chen Y., Kramarov A.A., Kusche-Gullberg M., Kramer J.M., Ackley B.D., Sieron A.L., Prockop D.J. and Fessler J.H. (2000)

Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases

Development **127**, 5475-5485

Kutach A.K. and Kadonaga J.T. (2000)

The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters

Mol Cell Biol **20**, 4754-4764

Lafuste P., Sonnet C., Chazaud B., Dreyfus P.A., Gherardi R.K., Wewer U.M. and Authier F.J. (2005)

ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation

Mol Biol Cell. **16**, 861-870

Lai Z.C., Fortini M.E. and Rubin G.M. (1991)

The embryonic expression pattern of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins

Mech Dev. **34**, 123-134

Langeland J.A. and Carroll S.B. (1993)

Conservation of regulatory elements controlling *hairy* pair-rule stripe formation

Development **117**, 585-596

Lawrence P.A., Johnston P. and Vincent J. P. (1994)

Wingless can bring out a mesoderm-to-ectoderm induction in *Drosophila* embryos

Development **120**, 3355-3359

Leiss D., Hinz U., Gasch A., Mertz R. and Renkawitz-Pohl (1988)

Beta 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis

Development **104**, 525-531

Lemmon M.A., Ferguson K.M. and Abrams C.S. (2002)

Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton

FEBS Lett. **513**, 71-76

Leptin M. (1991)

twist and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development

Genes Dev. **5**, 1568-1576

Lilly B., Galewsky S., Firulli A.B., Schulz R.A. and Olson E.N. (1994)

D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis

Proc Natl Acad Sci USA **91**, 5662-5666

Lilly B., Zhao B., Ranganayakulu G., Paterson B.M., Schulz R.A. and Olson E.N. (1995)

Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*

Science **267**, 688-693

Lim C.Y., Santoso B., Boulay T., Dong E., Ohler U. and Kadonaga J.T. (2004)

The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II

Genes Dev. **18**, 1606-1617

Lin L., Holbro T., Alonso G., Gerosa D. and Burger M.M. (2001)

Molecular interaction between human tumor marker protein p150, the largest subunit of eIF3, and intermediate filament protein K7

J Cell Biochem. **80**, 483-490

Linder S., Nelson D., Weiss M. and Aepfelbacher M. (1999)

Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages

Proc Natl Acad Sci USA **96**, 9648-9653

Linder S., Higgs H., Hufner K., Schwarz K., Pannicke U. and Aepfelbacher M. (2000)

The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex

J Immunol. **165**, 221-225

Linder S. and Kopp P. (2005)

Podomes at a glance

J Cell Sci **118**, 2079-2082

Loots G.G., Locksley R.M., Blankespoor C.M., Wang Z.E., Miller W., Rubin E.M. and Frazer K.A. (2000)

Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13 and 5 by cross-species sequence comparisons

Science **288**, 136-140

Lu M., Kinchen J.M., Rossman K.L., Grimmsley C., Hall M., Sondek J., Hengartner M.O., Yajnik V. and Ravichandran K.S. (2005)

A steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the DOCK180 family of GEFs

Curr Biol. **15**, 371-377

Ludwig M.Z., Patel N.H. and Kreitman M. (1998)

Functional analysis of eve stripe 2 enhancer evolution in *Drosophila*: rules governing conservation and change

Development **125**, 949-958

Ludwig M. Z., Bergman C., Patel N.H. and Kreitman M. (2000)

Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element

Nature **403**, 564-567

- Lukowitz W., Schroder C., Glaser G., Hulskamp M. and Tautz D. (1994)**
Regulatory and coding regions of the segmentation gene *hunchback* are functionally conserved between *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*
Mech Dev **45**, 105-115
- Luo L., Liao Y.J., Jan L.Y. and Jan Y.N. (1994)**
Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion
Genes Dev. **8**, 1787-1802
- Machado C., Sunkel C.E. and Andrew D.J. (1998)**
Human antibodies reveal titin as a chromosomal protein
J Cell Biol. **141**, 321-333
- Martianov I., Fimia G.M., Dierich A., Parvinen M., Sassone-Corsi P. and Davidson I. (2001)**
Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/TRF2 gene
Mol Cell **7**, 509-515
- McHugh B., Krause S.A., Yu B., Deans A.M., Heasman S., Mc Laughlin P. and Heck M.M. (2004)**
Invadolysin: a novel, conserved metalloprotease links mitotic structural rearrangements with cell migration
J Cell Biol. **167**, 673-686
- McNally A.K. and Anderson J.M. (1995)**
Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells
Am J Pathol. **147**, 1487-1499
- McNally A.K. and Anderson J.M. (2002)**
Beta1 und beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation
Am J Pathol. **160**, 621-630
- Menon S.D. and Chia W. (2001)**
Drosophila rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded
Dev Cell **1**, 691-703
- Menon S.D., Osman Z., Chenchill K. and Chia W. (2005)**
A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*
J Cell Bio **169**, 909-920
- Methot N., Song M.S. and Sonenberg N. (1996)**
A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3
Mol Cell Biol. **16**, 5328-5334

Methot N., Rom E., Olson H. and Sonenberg N. (1997)

The human homologue of the Prt1 protein is an integral part of the eukaryotic initiation factor 3 complex and interacts with p170

J Biol Chem. **272**, 1110-1116

Michiels F., Gasch A., Kaltschmidt B. and Renkawitz-Pohl R. (1989)

A 14 bp promoter element directs the testis specificity of the *Drosophila* beta 2 tubulin gene

EMBO J. **8**, 1559-1565

Mohler W.A., Simske J.S., Williams-Masson E.M., Hardin J.D. and White J.G. (1998)

Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in *Caenorhabditis elegans* hypodermis

Curr Biol. **8**, 1087-1090

Mohler W.A., Shemer G., del Campo J.J., Valanski C., Opoku-Serebuoh E., Scranton V., Assaf N., White J. G. and Podbilewicz B. (2002)

The type I membrane protein EFF-1 is essential for developmental cell fusion

Dev Cell **2**, 355-362

Monks C.R., Freiberg B.A., Kupfer H., Sciaky N. and Kupfer A. (1998)

Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T-cells

Nature **395**, 82-86

Moore A.W., Barbel S., Jan L.Y. and Jan Y.N. (2000)

A genome wide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*

Proc Natl Acad Sci USA **97**, 10436-10441

Moreau V., Tatin F., Varon C. and Genot E. (2003)

Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA

Mol Cell Biol. **23**, 6809-6822

Muga A., Neugebauer W., Hirama T. and Surewicz W.K. (1994)

Membrane interaction and conformational properties of the putative fusion peptide of PH-30, a protein active in sperm-egg fusion

Biochemistry **33**, 4444-4448

Mullis K.B., Faloona F., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., and Ehrlich, H.A. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction

Cold Spring Harbor symp. Quant Biol. **51**, 263-273

Murre C., McCaw P., Schonleber, Vaessin H., Caudy M., Jan L.Y., Jan Y.N., Cabrera C.V., Buskin J.N., Hauschka S.D., Lassar A.B., Weintraub H. and Baltimore B. (1989)

Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to common DNA sequence

Cell **58**, 537- 544

Nakai Y., Shiratsuchi A., Manaka J., Nakayama H., Takio K., Zhang J.T., Suganuma T. and Nakanishi Y. (2005)

Externalization and recognition by macrophages of large subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in apoptotic cells

Exp Cell Res.

Nolan K.M., Barrett K., Lu Y., Hu K.Q., Vincent S. and Settleman J. (1995)

Myoblast city, the *Drosophila* homolog of Dock180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes

Genes Dev. **12**, 3337-3342

Oda A., Ochs H.D., Lasky L.A., Spencer S., Ozaki K., Fujihara M., Handa M., Ikebuchi K. and Ikeda H. (2001)

CrkL is an adapter for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk

Blood **97**, 2633-2639

Ohler U., Liao G.C., Niemann H. and Rubin G.M. (2002)

Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome

Genome Biol **3**, research0087.1-0087.12

O'Neill E.M., Rebay I., Tjian R. and Rubin G.M. (1994)

The activities of the two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway

Cell **78**, 137-147

Osiak A.E., Zenner G. and Linder S. (2005)

Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling

Exp Cell Res. **307**, 342-353

Palacios I.M. and StJohnston D. (2001)

Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes

Annu Rev Cell Dev Biol. **17**, 569-614

Palovuori R. (2003)

Regulation of cell-cell adhesion and actin cytoskeleton in non-transformed and transformed epithelial cells

University of Oulu, Dissertation

Panitz F., Krain B., Hollemann T., Nordheim A. and Pieler T. (1998)

The Speman organizer-expressed zinc finger gene *Xegr-1* responds to the MAPkinase/Ets-SRF signal transduction pathway

EMBO J. **17**, 4414-4425

Papazian D.M., Schwarz T.L., Tempel B.L., Jan Y.N. and L.Y. (1987)

Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*

Science **237**, 749-753

- Patel N.H., Snow P.M. and Goodman C.S.** (1987)
Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axons pathways in *Drosophila*
Cell **48**, 975-988
- Paululat A., Holz A. and Renkawitz-Pohl R.** (1999)
Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis
Mech of Development **83**, 17-26
- Paululat A., Burchard S. and Renkawitz-Pohl R.** (1995)
Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*
Development **121**, 2611-2620
- Pavlath G.K. and Horsley V.** (2003)
Cell fusion in skeletal muscle- central role of NFATc2 in regulating muscle cell size
Cell Cycle **2**, 420- 430
- Petzelt C., Joswig G., Mincheva A., Lichter P., Stammer H. and Werner D.** (1997)
The centrosomal protein centrosomin A and the nuclear protein centrosomin B derive from one gene by post-transcriptional processes involving RNA editing
*J Cell Sci.***110**, 2573-2578
- Peyrefitte S., Kahn D. and Haenlin M.** (2001)
New members of the *Drosophila* Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loop helix genes
Mech Dev **104**, 99-104
- Pincheira R., Chen Q., Huang Z. and Zhang J.T.** (2001)
Two subcellular localizations of eIF3p170 and ist interaction with membrane-bound microfilaments: implications for alternative functions of p170
Eur J Cell Biol **80**, 410-418
- Pincheira R., Chen Q. and Zhang J.T.** (2001)
Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers
BrJCancer. **84**, 1520-1527
- Price M.D. and Lai Z.** (1999)
The yan gene is higly conserved in *Drosophila* and ist expression suggests a complex role throughout development
Dev Genes Evol **209**, 207-217
- Pütz M.** (2004)
Genregulatorische und funktionelle Analysen des differentiell exprimierten *rolling pebbles* Transkriptes *rols6* zeigen, dass das Rols6 Protein für die vollständige Differenzierung der Malphigischen Gefäße in *Drosophila melanogaster* notwendig ist
Philipps Universität Marburg Dissertation

Pütz M., Kesper D.A., Buttgereit D. and Renkawitz-Pohl R. (2005)

In *Drosophila melanogaster*, the rolling pebbles isoform 6 (Rols6) is essential for proper Malpighian tubule morphology
Mech Dev. **122**, 1206-1217

Purnell B.A., Emanuel P.A. and Gilmour D.S. (1994)

TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes
Genes Dev. **8**, 830-842

Rabenstein M.D., Zhou S., Lis J.T. and Tjian R. (1999)

TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family
Proc Natl Acad Sci USA **96**, 4791-4796

Ranganayakulu G., Zhao B., Dokidis A., Molkentin J.D. Olson E.N: and Schulz R.A. (1995)

A series of mutations in the D-MEF2 transcriptionfactor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*
Dev. Biol. **267**, 688-693

Rau A., Buttgereit D., Holz A., Fetter R., Doberstein S.K., Paululat A., Staudt N., Skeath J., Michelson A.M. and Renkawitz-Pohl R. (2001)

rolling pebbles (rols) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion
Development **128**, 5061-5073

Rau A. (2001)

Genetische und molekulare Analysen der *rolling pebbles (rols)*- Transkriptionseinheit sowie die Charakterisierung des Fusionsphänotyps weisen auf eine essentiell Funktion von Rols-LP in den Muskelvorläuferzellen hin
Philipps Universität Marburg Dissertation

Rebay I. and Rubin G.M. (1995)

Yan functions as general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway
Cell **81**, 857-866

Reichert N. (2004)

Entwicklung von Myotuben bei *Drosophila melanogaster*. Analyse zweier EMS induzierter Mutanten und Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen Rolling Pebbles und weiteren fusions-relevanten Proteinen
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg

Renkawitz-Pohl R., Hempel L., Hollmann M. and M.A. Schäfer (2005)

Spermatogenesis
Comprehensive Molecular Insect Science **1**, 157-179

Richards S., Liu Y., Bettencourt B.R., Hradecky P., Letovsky S., Nielsen R., Thornton K., Hubisz M.J., Chen R., Meisel R.P., Couronne O., Hua S., Smith M.A., Zhang P., Liu J., Bussemaker H.J., van Batenburg M.F., Howell S.L., Scherer S.E., Sodergreen E., Matthews B.B., Crosby M.A., Schroeder A.J., Ortiz-Barrientos D., Rives C.M., Metzler M.L., Muzny D.M., Scott G., Steffen D., Wheeler D.A., Worley K.C., Havlak P., Durbin K.J., Egan A., Gill R., Hume J., Morgan M.B., Miner G., Hamilton C., Huang Y., Waldron L., Verduzco D., Clerc-Blankenburg K.P., Dubchak I., Noor M.A., Anderson W., White K.P., Clark A.G., Schaeffer S.W., Gelbart W., Weinstock G.M. and Gibbs R.A. (2005)

Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution

Genome Res **15**, 1-18

Riechmann V., Irion U., Wilson R., Grosskortenhaus R. and Leptin M. (1997)

Control of cell fate and segmentation in the *Drosophila* mesoderm

Development **124**, 2915-2922

Rohrbaugh M., Ramos E., Nguyen D., Price M., Wen Y. and Lai Z.C. (2002)

Notch activation of *yan* expression is antagonized by RTK/pointed signaling in the *Drosophila* eye

Curr Biol. **12**, 576-581

Rubin G.M. and Spradling A.C. (1982)

Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors

Science **218**, 348-353

Ruiz-Gomez M., Coutts N., Price A., Taylor M.V. and Bate M. (2000)

Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion

Cell **102**, 189-198

Ruotsalainen V., Patrakka J., Tissari P., Reponen P., Hess M., Kestila M., Holmberg C., Salonen R., Heikinheimo M., Wartiovaara J., Tryggvason K. and Jalanko H. (2000)

Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis

Am J Pathol. **157**, 1915-1916

Rushton E., Drysdale R., Abmayr S.M., Michelson A.M. and Bate M. (1995)

Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development

Development **121**, 1979-1988

Russo C.A., Takezaki N. and Nei M. (1995)

Molecular phylogeny and divergence time of drosophilid species

Mol Biol Evol. **12**, 391-404

Ruvinsky and Ruvkun (2003)

Functional tests of enhancer conservation between distantly related species

Development **130**, 5133-5142

Scholz H., Deatrick J. Klaes A. and Klambt C. (1993)

Genetic dissection of *pointed*, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins
Genetics **135**, 455-468

Schröter R.H., Lier S., Holz A., Bogdan S., Klämbt C., Beck L. and Renkawitz-Pohl R. (2004)

kette and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*
Development **131**, 4501-4509

Schwander M., Leu M., Stumm M., Dorchies O.M., Ruegg U.T., Schnitny J. and Muller U. (2003)

Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly
Dev Cell **4**, 673-685

Seidel J.J. and Graves B.J. (2002)

An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors
Genes Dev **16**, 127-137

Shanina N.A., Ivanov P.A., Chudinova E.M., Severin F.F. and Nadezhdina E.S. (2001)

Translation initiation factor eIF3 probably binds with microtubules in mammalian cells
Mol Biol. **35**, 544-551

Shaw P.J., Wratten N.S. McGregor A.P. and Dover G.A. (2002)

Coevolution in bicoid-dependent promoters and the inception of regulatory incompatibilities among species of higher diptera
Evol Dev. **4**, 265- 277

Shen K., Fetter R.D. and Bargmann Cl. (2004)

Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1
Cell **116**, 869-881

Sisson J.C., Field C., Ventura R., Royou A. and Sullivan W. (2000)

Lava lamp, a peripheral golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization
J Cell Biol. **151**, 905-918

Small S., Blair A. and Levine M. (1992)

Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo
EMBO J. **11**, 4047-4057

Soeller W.C., Poole S.J. and Kornberg T. (1988)

In vitro transcription of the *Drosophila engrailed* gene
Genes Dev. **2**, 68-81

Stinchcombe J.C., Barral D.C., Mules E.H., Booth S., Hume A.N., Machesky L.M., Seabra M.C. and Griffiths G.M. (2001,a)
Rab27a is required for regulating secretion in cytotoxic T lymphocytes
J Cell Biol. **152**, 825-834

Stinchcombe J.C. Bossi B., Booth S. and Griffiths G.M. (2001,b)
The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges
Immunity **15**, 751-761

Strudwick S. and Borden K.L. (2002)
The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus
Differentiation **70**, 10-22

Strübelnberg M., Bonengel B., Moda L.M., Hertenstein A., de Couet H.G., Ramos R.G. and Fischbach K.F. (2001)
Rst and ist paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*
Development **128**, 4229-4239

Suzuki T., Li W., Zhang J.P., Tian Q.B., Sakagami H., Usuda N., Kondo H., Fujii T. and Endo S. (2005)
A novel scaffold protein, TANC, possibly a rat homolog of *Drosophila* rolling pebbles (rols), forms a multiprotein complex with various postsynaptic density proteins
Eur J Neurosci. **21**, 339-350

Takada S., Lis J.T. Zhou S. and Tjian R. (2000)
A TRF1:BRF complex directs *Drosophila* RNA polymerase III transcription
Cell **101**, 459-469

Tautz D. and Pfeifle C. (1989)
A non-radioactive *in situ* hybridisation method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveal translational control of the segmentation gene *hunchback*
Chromosoma (Berl.) **98**, 81-85

Taylor J.M., Dupont-Versteegden E.E., Davies J.D. Hassell J.A., Houle J.D. Gurley C.M. and Peterson C.A. (1997)
A role for the ETS domain transcription factor PEA3 in myogenic differentiation
Mol Cell Biol. **17**, 5550-5558

Trasher A.J. (2002)
Wasp in immune-system organization and function
Nat Rev Immunol. **2**, 635-646

Tskvitaria-Fuller I., Rozell A.L., Yin H.L. and Wülfing C. (2003)
Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization
J Immunology **171**, 2287-2295

Uruno T., Liu J., Li Y., Smith N. and Zhan X. (2003)

Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation

J Biol Chem. **278**, 26086-26093

Vidal M., Brachmann R.K., Fattaey A., Harlow E. and Boeke J.D. (1996)

Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions

Proc Natl Acad Sci. USA **93**, 10315-10320

Vinson C.R., LaMarco K.L., Johnson P.F., Landschulz W.H. and McKnight S.L. (1988)

In situ detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage

Genes Dev. **2**, 801-806

Vogt A.B., Spindeldreher S. and Kropshofer H. (2002)

Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains

Immunological Rev. **189**, 136-151

Volonte D., Peoples A.J. and Galbiati F. (2003)

Modulation of Myoblast fusion by Caveolin-3 in Dystrophic Skeletal Muscle Cells: Implications for Duchenne Muscular Dystrophy and Limb-Girdle Muscular Dystrophy-1C

Mol Biol Cell **14**, 4075- 4088

White-Cooper H., Schafer M.A. Alphey L.S. and Fuller M.T. (1998)

Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*

Development **125**, 125-134

Yagami-Hiromasa T., Sato T., Kurisaki T., Kamijo K., Nabeshima Y. and Fujisawa-Sehara A. (1995)

A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion

Nature **377**, 652-656

Zhang D, Pentilla T.L., Morris P.L. and R.G. (2001)

Cell-and stage-specific high-level expression of TBP-related factor 2 (TRF2) during mouse spermatogenesis


*Mech Dev.***106**, 203-205

Zhang Y., Featherstone D., Davis W., Rushton E. and Broadie K. (2000)

Drosophila D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation

J Cell Sci. **113**, 3103-3115

TTATCCAGCTGGTAAGAATACGATTCATACGGACTAACGGACGGACAGGCATACGGACGG 60
 AATAGGTCGACCATTCTTATGCTAAGTATGCCTGATTGCCTGCCTGTCCGTATGCCTGCC



ACAGAAGGACATACGGACAACTGACATGGTTAGATAGACTCGGCTAGTGTCTGATAAC 120
 TGTCTTCCTGTATGCCTGTTTGAAGTGTACCAATCTATCTGAGCCGATCACAGGACTATTG

GCTTCGCGTTACATGGTTTTCAAGAAAGCTAGCATACCCTTTTACTTAAAGCACAAATTG 180
 CGAAGCGCAATGTACCAAAAGTTCTTTGATCGTATGGGAAAATGAATTTCTGTGTTAAC

TGTATAAATTTGTTGTATGCATTAATTTTTATTGGAGTGGCCAGAACCCAGGACACTTT 240
 ACAATATTTAAACAACATACGTAATTAATAAACCTCACCGGTCTTGGGTCCTGTGAAA

CCAGGATACAAGTTCTGTGTGCGCTCTAAATCATGCCCTACATAATGCGGCTCATTTTG 300
 GGTCTATGTTCAAGACACACGCGAGATTTAGTACGGGATGTATTACGCCGAGTAAAC

CTTAACAGCTCTACGTTTCGCTTATTGATCAAATAGACAATCTTAAGCTAACTTAAATAT 360
 GAATTGTCGAGATGCAAGCGAATAACTAGTTTATCTGTTAGAATTCGATTTGAATTTATA

CCAAGCTGACTCACTTTTTAAAAATTACCATTGATTGGAAAATAGCGAACGTCCGCAGGA 420
 GGTTGCACTGAGTGAAAAATTTTAAATGGTAACTAACCTTTTATCGCTTGCAGGCGTCCT

AGATCTAAAGAAATGGATGGAAATGGTTATACCGTTCATGGCGTAGAGTTTATCGAGCAT 480
 TCTAGATTCTTTACCTACCTTTACCAATATGGCAAGTACCGCATCTCAATAGCTCGTA

ACAAAGTAGAGTCAAGTTTATAACAGAATACTGTGTATGGGCATAAAAATGTTAATAAAT 540
 TGTTTCATCTCAGTTCAAATATTGTCTTATGACACATACCGTATTTTACAATTATTTA

ATACAATTAGCTCTATTAAGAATACACAATACAAATAAGATTAAACCACCCTCGTTTTTA 600
 TATGTTAATCGAGATAATTCTTATGTGTTATGTTTATTCTAATTTGGTGGGAGCAAAAAT

GTCCACGTCAGCCAAAACACAACCCTTTATTAGCCAGGTCAGCAACCAATGGTCGTAGTT 660
 CAGGTGCAGTCGGTTTTGTGTTGGGAAATAATCGGTCCAGTCGTTGGTTACCAGCATCAA

CCATAAACGAACAGAATACACACTTTAATGGCGCCACATACGATATCGCAAGTCTGCTTA 720
 GGTATTTGCTTGTCTTATGTGTGAAATTACCGCGGTGTATGCTATAGCGTTCAGACGAAT

TGTTCCACATCATATCAATAATATCCAAATTTAAATTTACTTAAACGATATTGAAGTTT 780
 ACAAGGTGTAGTATAGTTATTATAGGTTTAAATTTTAAATGAATTTGCTATAACTTCAA

AGCACTGCGCTTTTATATCTACATTAGAAAGGCATATTCTCTATGCATTCCGATCAAAA
 TCGTGACGCGAAAAATATAGATGTAATCTTTCCGTATAAGAGATACGTAAGGCTAGTTTTT 840

GCGATCAATTGCCGCAAATCCTCATGAACTCTAAAATTTATGTGAGGTTCCCAATAAT
 CGCTAGTTAACGGCGTTTAGGAGTACTTGAGATTTTAAATACACTCCAAGGGTGTTATTA 900

TTATCAGTACGTGGAGTGCTCGAGTAATCTTCCAAGATTAAGAGGATTTCTTGAGCAGGC
 AATAGTCATGCACCTCACGAGCTCATTAGAAGGTTCTAATTCTCTAAAGAACTCGTCCG 960

CGACCATTTGTCACAAATCATTCAAACACCAAGGGGACGAGAACGAATGGGAGTCGCACG
 GCTGGTAAACAGTGTTTAGTAAGTTTGTTGCCCTGCTCTTGCTTACCCTCAGCGTGC 1020

— ROPRD —

GTGGAAAGTGAAGTGATATTAAAGTGGGCAAAGATAAATACGGGGAAAGCGAGAAATTG
 CACCTTTCACCTTCACTATAATTTACCCGTTTCTATTTATGCCCTTTCGCTCTTTAAC 1080

— ROPRD —

AAACAGTTGCTAGGAAAAATCACCGAAATTCAGCGCCTGAGCGCAGCAGTTCCAGCGAA
 TTTGTCAACGATCCTTTTTAGTGGCTTTAAGGTCGCGGACTCGCGTCGTCAGGTCGCTT 1140

GCGTTCATCTATCGTGTAAATACAATCCGTGCGTAACTATAACTACTTAGTACACGGATGC
 CGCAAGTAGATAGCACATTATGTTAGGCACGCATTGATATTGATGAATCATGTGCCTACG 1200

ATCTTGTATCTTCGATCCGCGAGGTCGACGAACTCCGTTCCGTAATGCGCATGCGTCGCC
 TAGAACATAGAAGCTAGGCGCTCCAGCTGCTTGAGGCAAGGCATGACGCGTACGCAGCGG 1260

GCCTTCGCGGGAAGTGTGTCCTCCTGTCGCTGTCATCCAATTTCAAACATGAAAAATTA
 CGGAAGCGCCCTTCACACAGGAGGACAGCGACAGTAGGTTAAAGTTTTGTACTTTTTAAT 1320

GTCCATTTCCGTGCGCATAGATCCGTGGATGCCAGCCCCATGTGCTCACCTCGGCTCATCC
 CAGGTAAAGGCAGCGTATCTAGGCACCTACGGTCGGGTACACGAGTGGAGCCGAGTAGG 1380

E-Box

TTGGCTCCGGGTTGAACGAACTGCAATTGTATCCCGTCCTGCGCGGCAGACTTGTTGCC
 AACCGGAGGCCCAACTTGCTTGACGTTAACATAGGGCAGGACGCGCCGTCTGAACAACGG 1440

GTTGCGTTGGAAATCTCACCTATGGGCATTGAACTCCGGCTCAGGATTGCTTATTGGG
 CAACGCAACCTTTTAGAGTGGGATACCCGTAACCTGAGGCCGAGTCCTAACGAATAACCC 1500

GTTGTGGTTTAGGTGGTTCTGGATTCCCAGGTACAGTCACCGGGATCTAGGCTAATTGGA 1560
 CAACACCAAATCCACCAAGACCTAAGGGTCCATGTCAGTGGCCCTAGATCCGATTAACCT



AAAGAATGCAGCAACGCAGAAAATAATATGTAATCTGTGGCCAATGACAGCATTTGCTAA 1620
 TTTCTTACGTCTGTGCGTCTTTTATTATACATTAGACACCGTTACTGTCGTAAACGATT



TCACTCCAACAGGTGTTGCATCATTGCAATTTACGAGTTGTTTATAATAAAACGAAACAG 1680
 AGTGAGGTTGTCCACAACGTAGTAACGTTAAATGCTCAACAAATATTATTTGCTTTGTC



TGAATTTAAAATACATTTAAAAATTGATGTATAAATGGAAATCGAAAATACCTGAAATTG 1740
 ACTTAAATTTTATGTAAATTTTAACTACATATTTACCTTTAGCTTTTATGGACTTTAAC

GAATTAAACCTACATATGCATATGTATCTCAAACTTATTATTGATCATTGTACATATAT 1800
 CTTAATTTGGATGTATACGTATACATAGAGTTTGAATAATAACTAGTAACATGTATATA



AACATATTAATGTTACTTATGTAACGTTAGAGCTTTGTAAAGTTGCAGTCCCATCTT 1860
 TTGTATAATTACAATGAATACATTGAGCAATCTCGAAACATTTCAACGTCAAGGGTAGAA

TCACTAACGATTTGGATATATAAACTTAGTCATAATTCTGCCATGTTAAGACTTTTGGGG 1920
 AGTGATTGCTAAACCTATATATTTGAATCAGTATTAAGACGGTACAATTCTGAAAACCC

TATACTTCGACCATTCCACTCCCCTAAACACACAGAGTAAAGTCCGACAGCCAAGATCGC 1980
 ATATGAAGCTGGTAAGGTGAGGGGATTTGTGTGTCTCATTTCAGGCTGTCGGTTCTAGCG



AGTGCAATTAAATGGCAACCAAGCAAGCGACACTTTGGTTTCGCTGCCAACTCCACTCC 2040
 TCACGTTAATTTACCGTTGGTTCGCTGTGAAACCAAGCGACGGTTTGAGGTGAGG

GCTCGAGTCCACCCCACTCACCCCTTTTCTTGGGAAAAGATGGGGCACATCCCATTAG 2100
 CGAGCTCAGGTGGGGGTGAGTGGGGGAAAAGAACCCTTTTCTACCCCGTGTAGGGTAATC

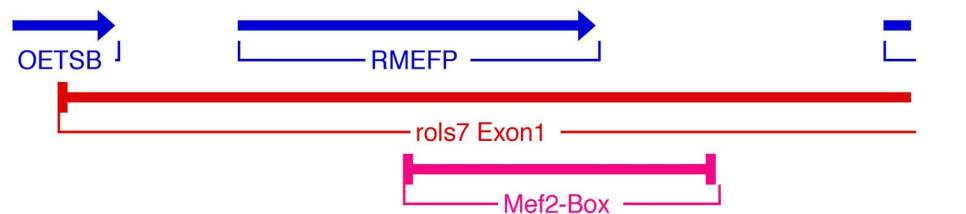
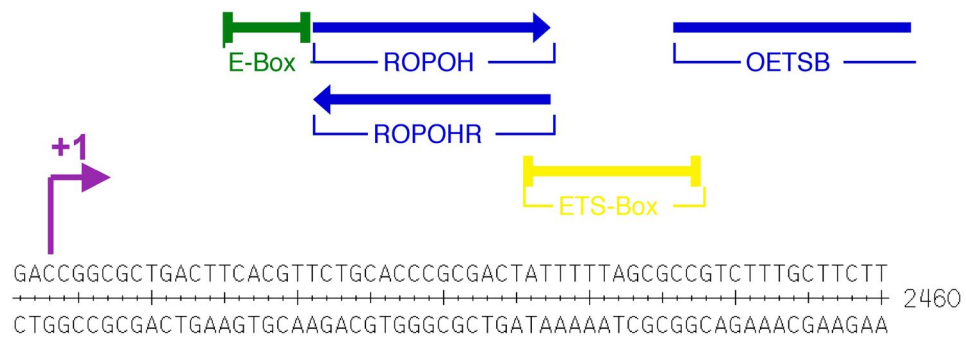
AAACCGAGAACACTTCGCGGGGTGCAGCGAGAACAGACGCAACGTCTGCTTTTGAAGCCA 2160
 TTTGGCTCTTGTGAAGCGCCCCACGTCGCTCTTGTCTGCGTTGCAGACGAAAGCTTCGGT

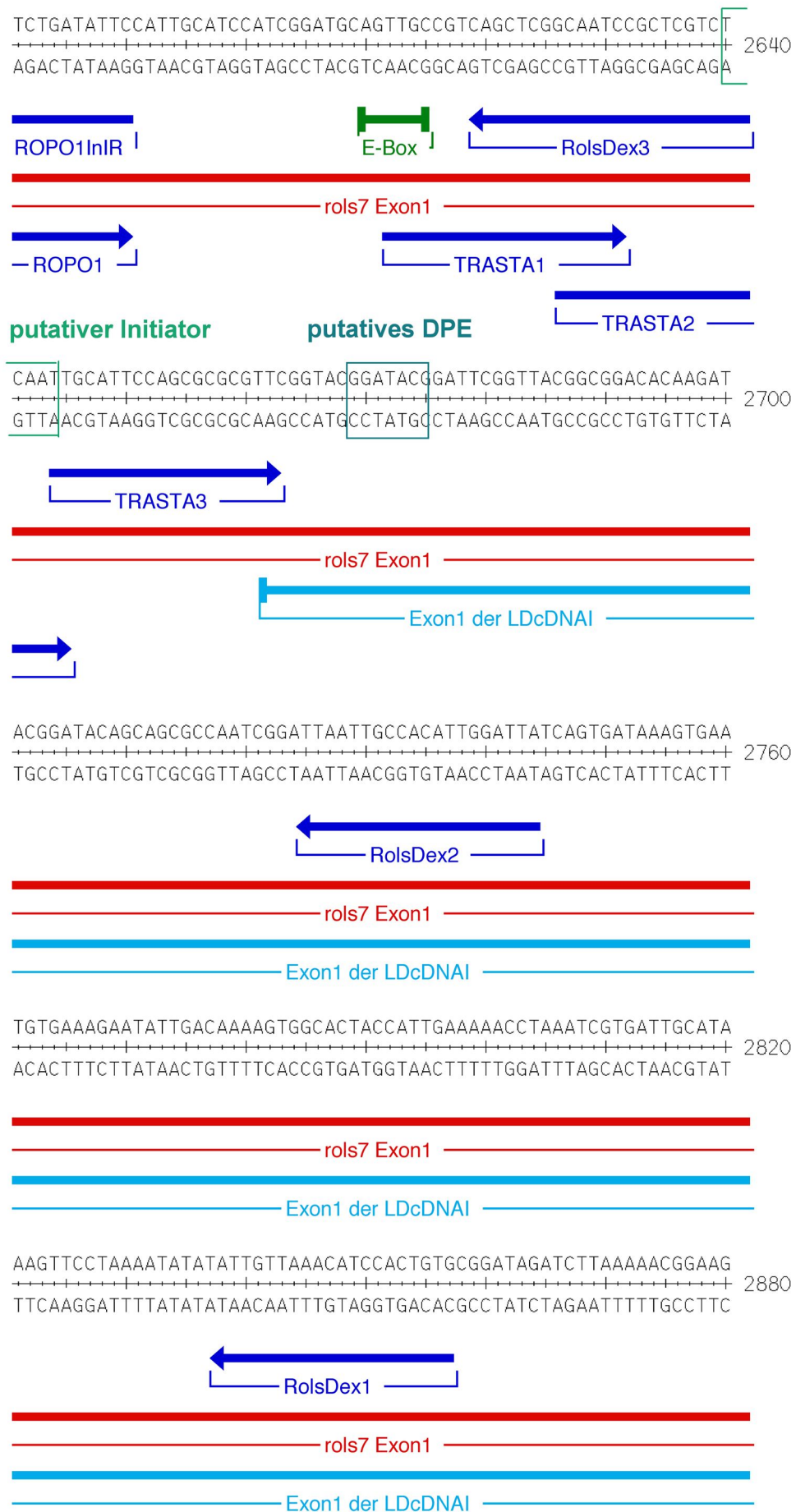
GATATGTTTCAGAAATGAAATGTAAATGTTGCTAAAATAATATGATAAATGAAGTTAATTAA
 CTATACAAGTCTTACTTTACATTTACAACGATTTTATTATACTATTTACTTCAATTAATT 2220

ATCTATAATAAAAGAAAATTAATACTTATAAACTGTATAATTATAGTTTGCAAAATATT
 TAGATATTATTTTCTTTAATTTATGAATATTTGACATATTAATATCAAACGTTTTATAA 2280

TAAAAATATTATGTAATAATTCTATGCACGATTGGAGAACTATTTGATTTTCCAACTTTT
 ATTTTATAATACATTATTAAGATACGTGCTAACCTCTTGATAAACTAAAAGGTTGAAAA 2340

GGCTGAAAAATGTCCAAATGGGCAACGCAGCTCTGGAAACGGAATCTAACAAAAGTGATG
 CCGACTTTTACAGGTTTACCCGTTGCGTCGAGACCTTGCCTTAGATTGTTTTCACTAC 2400





GGAAACTGAAATTCAGGATTGTTCCAAC TAGA ACTTATCATCTTGTACAAGCAGAGGA 2940
 CCTTTTGACTTTAAGGTCCTAACAAAGGTTGATCTTGAATAGTAGAACATGTTCTGCTCCT



ATTATAAAAGATATTAAAGGTTTGTATTAAAAATGTATACGCATATATTGTAGCATACTT 3000
 TAATATTTTCTATAATTTCCAAACATAATTTTACATATGCGTATATAACATCGTATGAA



TTTTGATTATTAATAATCATTAAAGTTCAAATGAATGCACTTCAATCATTGGCGGATATG 3060
 AAAACTAATAATTTTAGTAATTTCAAGTTTACTTACGTGAAGTTAGTAAACCGCCTATAC

AAACTACAACAGCTTGACTTTAAAAATCCATAAAGATCCATTCAATTTACTATTACCTAG 3120
 TTTGATGTTGTGCGAACTGAAATTTTAGGTATTTCTAGGTAAGTTAAATGATAATGGATC

TACATTTCTCAAAGAATTTTCATATAACTTTCTGAATAAGTTTTTATAAAAGCTCAATAT 3180
 ATGTAAAGAGTTTCTTAAAGTATATTGAAAGACTTATTCAAAAAATATTTTCGAGTTATA

AATCGCGCAATGAGTAATGCCAAGTAATTCGATGTCGCCTAGTATCTGGTGGAATGCGC 3240
 TTAGCGCGTTACTCATTACGGGTTTCAATTAAGCTACAGCGGATCATAGACCACCTTACGCG

AATATCTCGCCGATCTGGCGGATCGGGTCTAAAAAGGGAGCATCGTTCAAGTGACCATAT 3300
 TTATAGAGCGGCTAGACCGCTAGCCAGGATTTTCCCTCGTAGCAAGTCACTGGTATA

CCCAGGGCATTAAAGTGGAATGTCTTGAGCGGCGAGCCGAAACAAAGGCAGCTGAATTT 3360
 GGGTCCCGTAAATTCACCTTTACAGAACTCGCCGCTCGGCTTTGTTTCCGTCGACTTAA

AAATTGGGAACCAACTGAAAAATGTCGCATGTTTCGATGGGGCGCCATTGGCTCGAAAAAT 3420
 TTAAACCCTTGTTGACTTTTTACAGCGTACAAGCTACCCCGGGTAACCGAGCTTTTA

GTGTAAAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAGATGTAAACAACACAAAAAGAGTGAAAGA 3480
 CACATTTTACTTTTTTTTTTTTTTATTATTCTACATTTGTTGTGTTTTTCTCACTTTCT

AAGAAGCACAAGTTCAAGACTCTCACAGATACTCCACACGCACACAACCTCAGCCGTGGC 3540
 TTCTTCGTGTTCAAGTTCTGAGAGTGCTATGAGGTGTGCGTGTGTTGGAGTCGGCACCG

ATAGCTAAAAGTAGAAACGCGCGCAGACGAAGCAATAAACTGCACGGAAGTAGTTTAAT
3600
TATCGATTTTCATCTTTGCGCGCGTCTGCTTCGTTATTTGACGTGCCTTTTCATCAAATTA
GCAGTTTGCTGGGGATCCTAGAGCCCCCTGCATCCCCACGCCCTCCCTTCGCGCCACGCC
3660
CGTCAAACGACCCCTAGGATCTCGGGGGACGTAGGGGTGCGGGAGGGAAGCGCGGTGCGG
CCTTGGCGCACGACAAACAACCTACAAATACAACAAATGCAACCACGGCGCGCCGCCAACC
3720
GGAACCGCGTGCTGTTTGTTGATGTTTATGTTGTTTACGTTGGTGCCGCGCGGCGGTTTG
CCAGTTTTCCGCCGCCGATCGTTTGGCCGATCTATTTTCGTACCGCTTAGGGATGTGTAG
3780
GGTCAAAGGCGGCGGCTAGCAAACCGGCTAGATAAAAGCATGGCGAATCCCTACACATC
TTTTTCGTCGCCTAGAGTAATTTGTTTGTTGCATTAGTTTTGTGGAAAATCTACACTGCA
3840
AAAAAGCAGCGGATCTCATTAAACAAACAACGTAATCAAAACACCTTTTAGATGTGACGT
AAAAAATGTAATAGCTAATCTATATACATAAGTAAATGTAAGTAAGATTTATAAAGACGA
3900
TTTTTTACATTATCGATTAGATATATGTATTCATTACATTCATTCTAAATATTTCTGCT
CAGAAGAATGAAGGCATAATGATTTGATCAGATATATTTATTAATATAAGTTACTTCCCT
3960
GTCTTCTTACTTCCGTATTACTAACTAGTCTATATAAATAATTATATTCAATGAAGGGA
ATAGTAAATATGATATAATCATATATGCCATTAGATAGATATAGCTATATTAACCTTATA
4020
TATCATTTATACTATATTAGTATATACGGTAATCTATCTATATCGATATAATTGGAATAT
TGGCTCCAAAACCATTTTAATAGATATTCATAATATTTTTGTGCCGCTTTTCAAAGATAT
4080
ACCGAGGTTTGGTAAAATTATCTATAAGTATTATAAAAAACACGGCGAAAAGTTTCTATA
TTCTTAAATACAAAACCTGCAAAAACATAAAAAATAGCAGTGCATAATCGCCAAACCTAAGC
4140
AAGAATTTATGTTTTGACGTTTTTTGATTTTTTATCGTCACGTATTAGCGGTTTGGATTCTG
AAACTGCAAAACCAAGTTTCAGCCCCGACTAAAGCGAATTTGCCCGCAAACCAACCGATGGC
4200
TTTGACGTTTGGTTCAAGTCGGGGCTGATTTTCGCTTAAACGGGCGTTTGGTTGGCTACCG
AATGTTTATTTAAACCTTTGCACTGCCAAAGTCAACTTGCAACTTGTGGTGGCAGTGGCA
4260
TTACAAATAAATTTTGAAACGTGACGGTTTCAGTTGAACGTTGAACACCACCGTCACCGT
CAAGCCAAACGTTAGTTTTTCCCCAGCGAATCTAAAATAATGGAATGGGGGACCCAACGG
4320
GTTTCGTTTGAATCAAAAAGGGGTGCGTTAGATTTTATTACCTTACCCCTGGGTTGCC

CAGCAACAATAACTATTGCAACACCTAGTCGAGGGGAAAGTTAGGGGGAGCAGAGGAAGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTTGTTATTGATAACGTTGTGGATCAGCTCCCCCTTCAATCCCCCTCGTCTCCTTCC 4380

GGGGATGGATATGTCAAGAGGCCGATGACATTGCTAAAGAACTACAGTCAAACCTTCGCTA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCTACCTATACAGTTCTCCGGCTACTGTAACGATTTCTTGATGTCAGTTGAAGCGAT 4440

AGCCCAACTTTCAATTTCTAAGAAAATCTCGCATAGTTAAACCTATTATAGGTATTGTAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCGGGTTGAAAGTAAAGATTCTTTAGAGCGTATCAATTTTGGATAATATCCATAACATT 4500

TTGTTCGAATATTCTGGAAGTGCATACTATACCCTCTGATATTTGATTTTCATGTTACT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAAAGCTTATAAGGACCTTTCACGTATGATATGGGAGACTATAAACTAAAGTACAATGA 4560

TAAGATCCACTGTACTTCGAGTTCCTTGCACCGAGGAAGAAGCAGCTGAGGAAAACACCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTCTAGGTGACATGAAGCTCAAGGAACGTGGCTCCTTCTTCGTCGACTCCTTTTGTGGT 4620

GAATCGCTGCAGGGGGCACCTCACAATTGAACAAGATAGAAAGATACGCACGCGCACCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTAGCGACGTCCCCCGTGGGAGTGTGAACCTGTTCTATCTTCTATGCGTGCGCGTGGT 4680

AATGTGAGCGAGATGCGCATGTGGCCATAAAAACGAGGGGAAGTTCGTTGTCTATCGCCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTACACTCGCTCTACGCGTACACCGGTATTTTGTCTCCCTTCAAGCAACAGATAGCGGA 4740

GGGGGACACTTCCGTCTCCATTCTGTGTGCTCCGCGAGTGCCCTGCATGTCTGCAGTTGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCCCTGTGAAGGCAGAGGTAAGGACACACGAGGCGTCACGGGACGTACAGACGTCAACG 4800

CATGTACGCGAGTACCCCATGTGCCCCATTTCCCCGGGCTGCCTCCTTCCATGTGGGAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTACATGGCGTCATGGGGTACACGGGGTAAAGGGGCCCGACGGAGGAAGGTACACCCTTG 4860

TGCTGGAGCCGAAGATTGATGTTGGGACAATTTACGTCCCACTGTTGCTGGGCATTAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGACCTCGGCTTCTAACTACAACCCTGTTAAAGTGCAGGGTGACAAGCGACCCGTAATT 4920

GTGGCATTAAAGTTGTCCCGGCTTATCGCTATCTCACAAGCACAAGCTCGCACCTCAAGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCGTAATTTCAACAGGGCCGAATAGCGATAGAGTGTTCGTGTTGAGCGTGGAGTTCT 4980

TGCACCTACACTGAGAGAAATCCATGCCACGAGCTAAAGTGAACCTCTAAACTAGAAGCCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTGGATGTGACTCTCTTTAGGTACGGTGCTCGATTTCACTTGAGATTTGATCTTCGGG 5040

GCCCATTACAGACTTACAATTACAATTTTAGGATCTAAGCCCGAAATCAAACCTATAGCTA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGTAATGTCTGAATGTTAATGTTAAAATCCTAGATTCGGGCTTTAGTTTGATATCGAT 5100

[illegible]

CAGATTGTAACAAATCAGATTGGTTTAAAAAGATAGTTTTGTAGATTGGGACAAAGTAT 5220
GTCTAACATTGTTTAGTCTAAACCAAAATTTTCTATCAAAACATCTAACCTGTTCATA

TTCTCCGTGTTTTATCTGCCTAGCTAGCTCAACTGATCTGAACTCATTTCGCTGGAAA 5280
AAGAGGCACAAAAATAGACGGATCGATCGAGTTGACTAGACTTGAGTAAAGGCGACCTTT

TCCCCATATTCGAGTGCCTTTTCATGGAGGACCGTTAAATCAAGACAGCCCCAAAATTA
AGGGGTATAAGCTCACGCAAAAGTACCTCCTGGCAATTTTAGTTCGTGCGGGGTTTTAAT 5340

CATATGTCAAATTATGTTTAATGTGCGCATTAGTCAGGTACAGTGGTGTTCAGAGAAGC 5400
GTATACAGTTTAATACAAATTACACGCCGTAATCAGTCCATGTCACCACAAATCTCTTCG

TACTGGTGCTCGTAAATGGGGAGAAATGCAAAGAAAGCATTACCTTTTATAGCTCAAATC 5460
ATGACCACGAGCATTTACCCCTCTTTACGTTTCTTTCGTAATGGAAAATATCGAGTTTAG

CATACAAAGATACTTTTAAATGTACAGTGCCATACTTCTTGTTGACTTTAAGATTGTATT 5520
GTATGTTTCTATGAAAATTTACATGTCACGGTATGAAGAACAACCTGAAATTCTAACATAA

TTAACCGTAAGCTAAAAAAATAAAAAAGCATTACCCCATTTTGAATACTTTAA 5580
AATTGGCATTGATTTTTTTTATTTTTTCGTAATTGGGGTAAAACTTTATGAAATTT

TATGAAAATAATATATTTAAATATTTTACAGTATGCCCTCGCTGCAGCAAATTGCGCTCG
ATACTTTTATTATATAAAATTTATAAAATGTCATACGGGAGCGACGTCGTTTAAACGCGAGC 5640



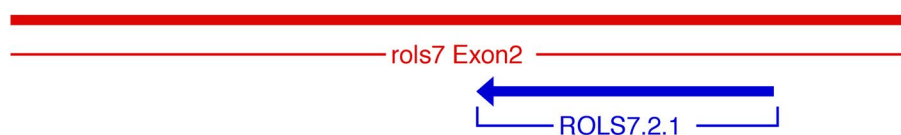
CGATGGAAGGTGACCAATCGGAGCTACAGACACCGCCGCTGCCGATCAACCCGCCGCCCA 5700
GCTACCTTCCACTGGTTAGCCTCGATGTCTGTGGCGGCACGGCTAGTTGGCGGCGGGT



AGGTGATGGCCAATGGAATCGTCTATGGCTTTCGCACCCGACACTTGTCTGCATCGAGG
TCCACTACCGGTTACCTTAGCAGATACCGAAAGCGTGGGCTGTGAACAGGACGTAGCTCC 5760



AGAACGACTCGGACTCGTTGCACGGATCGTCCATTCCACATGCCTACGATATGATGCAGC 5820
TCTTGCTGAGCCTGAGCAACGTGCCTAGCAGGTAAGGTGTACGGATGCTATACTACGTCG



AGGCGGACGAGACCTTCCAGAAGTTGAATGCCAACGAGGAGCAGGACGAGTCGGGTAGCG 5880
TCCGCTGCTCTGGAAGGTCTTCAACTTACGGTTGCTCCTCGTCTGCTCAGCCCATCGC



AGGATGGGGGATTGGAGAATCTGGACGATACGATCGCAATGATCGATGAATCGCGCCTTT 5940
TCCTACCCCTAACCTCTTAGACCTGCTATGCTAGCGTTACTAGCTACTTAGCGCGGAAA



TGGAGGCCGATTATCTGGATGAGCTCGTGGCCGAGGAGCAGTTGCAGGAGCAGGACGAGG 6000
ACCTCCGGCTAATAGACCTACTCGAGCACC GGCTCCTCGTCAACGTCCTCGTCTGCTCC



ATGAGGAGGAATCCTCTGATCTTGTGACTCTGGCAATGTGGAGGAGGATTTCTGGCAGC 6060
TACTCCTCCTTAGGAGACTAGAACAGCTGAGACCGTTACACCTCCTCCTAAAGACCGTCG



CGAGCTTCAATCGGAATGACATCATGATGACCTCGGTTTATGGAGCTCTGAATGGCTCGT 6120
GCTCGAAGTTAGCCTTACTGTAGTACTACTGGAGCCAAATACCTCGAGACTTACCGAGCA



TGACGAGCGAAGTGTCTTCAACTGCAGCGCCGGGCTACTCCGAGTGTGCCACGCCAGAA 6180
ACTGCTCGCTTCACAGAAGTTGACGTCGCGGCCGATGAGGCTCACACGGTGCGGGTCTT



AGGAGGCGGAACCCGTTTATGCCACGCCGAAAAGCGACGAGCCAGCAATCGGAGTTTCG 6240
TCCTCCGCCTTGGGCAAATACGGTGCGGCCTTTTCGCTGCTCGGTGCTTAGCCTCAAAGC



ACTCCACCTGCGCCTCGCTCACCAGTTCCTTATACGGCGGATCTATGAACTCCTCGCTGG
----- 6300
TGAGGTGGACGCGGAGCGAGTGGTCAAGGAATATGCCGCCTAGATACTTGAGGAGCGACC



ATCTCAAGTACTCATCCTTGGGTGGTGGCGACTCGGTCAAGTGGTGGCATTAGTGGAACCA
----- 6360
TAGAGTTCATGAGTAGGAACCCACCACCGCTGAGCCAGTCACCACCGTAATCACCTTGGT



GCACTTTGCGAGGAACTTCAGTGCCGCCAATGGATCTGTCCATGATATCCAGCGATGGCG
----- 6420
CGTGAAACGCTCCTTGAAGTCACGGCGGTTACCTAGACAGGTACTATAGGTCGCTACCGC



TTAGTGCGCTGGACTGGGGATCTGCCAGTGTGAGCTGTGTTTTGGACTCCGGCGATGGGA
----- 6480
AATCACGCGACCTGACCCCTAGACGGTCACACTCGACACAAAACCTGAGGCCGCTACCCT



ATCCCGCCGAGGAGCTCAACGAGGAAATGGCCGCCAAGTGCTTGAGTGCAGCGGAAAGTG
----- 6540
TAGGGCGGCTCCTCGAGTTGCTCCTTTACCGGCGGTTACGAACTCACGTCGCCTTTTAC



G
➤ 6541
C



Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| AMG | anterior midgut primordium, anteriores Mitteldarmprimordium |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CIP | alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm |
| DIG | Digoxygenin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Dexoxyribonukleotid |
| DPE | Downstream Promotor Element |
| DRE | DNA replication-related element |
| ENT | Entoderm |
| FBGC | Foreign Body Giant Cell |
| FCM | fusionskompetente Myoblaste |
| kb | Kilobasen |
| mg | midgut, Mitteldarm |
| MpT | malphigian tubules, Malphigiegefäße |
| mRNA | Messenger RNA, Boten-RNA |
| ph | Pharynx |
| PIC | Präinitiations-Komplex |
| PILMAC | Podosome and Immunological synapse Like Myogenic Adhesive Complex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rmp | Rounds per minute |
| sm | somatische Muskulatur |
| TSS | Transkriptional start site, Transkriptionsstart |

| | |
|----|----------------------|
| U | Unit |
| UV | ultraviolette Licht |
| vm | viscerale Muskulatur |

Danksagung

Nachdem die Fertigstellung dieser Arbeit einen doch nicht ganz unwesentlichen Anteil meiner Zeit hier an der Uni Marburg in Anspruch genommen hat, ist es schön abschließend auf die Hilfe und Unterstützung zurück zu blicken, die ich von so vielen Leuten erfahren habe.

Zunächst möchte ich natürlich Frau Prof. Renate Renkawitz- Pohl für die Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeitszeit danken. Ihr Optimismus und ihre positive Einstellung haben viel zu der in der AG Renkawitz- Pohl herrschenden angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen. Auf eine neue Idee oder einen guten Ratschlag konnte man sich auch auf „Durststrecken“ bei der Arbeit immer verlassen.

Einen maßgeblichen Anteil an dem Gelingen dieser Arbeit hatte auch Dr. Detlev Buttgeriet, der sich für jede meiner Fragen Zeit genommen hat und mich insbesondere fachlich aber auch „computertechnisch“ immer gut beraten hat.

Herrn Prof. Dr. Uwe Maier möchte für die Übernahme des Zweitgutachtens danken, außerdem gilt zwei Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe- Oliver und Stefan- mein besonderer Dank für ihre Geduld und Hilfe bei der Primer- Extension

Für die nette Zusammenarbeit in „meinen“ Labor 3020 möchte ich herzlich Nina (groß) und Nina (klein), sowie Christiana und Ruth (selbstverständlich auch für die Übernahme der Mikroinjektionen) danken. Bei unseren jetzigen Diplomandinnen Barbara und Susanne möchte ich mich für die lustigen Mensagänge und das freundlichen „Mobbing“ (ihr wisst schon was gemeint ist) bedanken. Zu den netten Mensagängen (und sonstigen Kaffe- und Teepausen, sowie diversen Kneipenabenden) haben natürlich auch Angela, Björn, Eva und Gritt beigetragen.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Christina, Jotti, Roxi und den weiteren Mitgliedern des Labors 3064 und bei Susanne Ö. die das gesamte „Werk“ gelesen hat und mich mit zahlreichen guten Tipps versehen hat.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch Sabina, Nadine und Inge, deren Arbeit mein Vorwärtskommen leichter gemacht hat.

Neben den jetzigen Mitgliedern der AG Renkawitz- Pohl möchte ich mich auch bei den Leuten bedanken, die meine Zeit dort bereichert haben aber mittlerweile anderweitig beschäftigt sind. Dazu gehört natürlich Leonie, die von Anfang an eine gute Freundin war, sowie Dominik, Peter, Britta, Verena und Karen. Außerdem das gesamte ehemalige 3008- Labor.

Neben den Freunden und Kollegen die mich durch ihre Zusammenarbeit unterstützt haben, möchte ich auch allen anderen Freunden wie Verena, Petra, Dirk, Vera, Jens, Claudia, Lotte, Alex, Felicitas, Nicole, Rita und Anja danken.

Zum Schluss möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, welche die Anfertigung dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. An erster Stelle kommen hier natürlich meine Eltern, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich immer verlassen konnte. Auch meine Geschwister Astrid, Ingrid und Martin waren immer für mich da.